

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790122

研究課題名(和文)動物におけるペントースリン酸副経路の同定

研究課題名(英文)Identification of alternative pentose phosphate pathway in animals.

研究代表者

近藤 嘉高(Kondo, Yoshitaka)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：20507397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ペントースリン酸経路は、グルコース6-リン酸をグルコノラクトン6-リン酸、グルコン酸6-リン酸を経て、グリセルアルデヒド3-リン酸に代謝し、NADPHおよび核酸原料の供給を担う。細菌類では、グルコースからグルコノラクトン、グルコン酸を経て、グルコン酸6-リン酸に至る副経路が知られている。しかし、動物において副経路が存在するかどうかは不明である。本研究では、ヒトおよびマウスにおいてグルコン酸をグルコン酸6-リン酸にリン酸化するグルコン酸キナーゼの遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：In pentose phosphate pathway, glucose 6-phosphate is converted to glyceraldehyde 3-phosphate via glucono-1,5-lactone 6-phosphate and 6-phospho gluconate to produce NADPH and various hexose which is necessary for a synthesis of nucleic acid. It is known that alternative pathway from glucose to 6-phospho gluconate through gluconolactone and gluconate exists in bacteria. However, it remains unclear whether the alternative pathway exists in animals. In this study, we identified the gluconokinase gene which catalyzes a phosphorylation of gluconate to 6-phospho gluconate in human and mouse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：代謝 生化学 酵素 動物 ペントースリン酸経路 グルコン酸キナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

SMP30 (加齢指標タンパク質 30) は、私たちの研究グループが発見し遺伝子をクローニングした、加齢に伴い減少するタンパク質である (Fujita, T. et al., *BBA*, 1992)。SMP30 遺伝子は、細菌からヒトまで存在しており、哺乳類では 90% 以上の相同性を有する。その分子機能は長い間不明であったが、私たちは 2006 年に、SMP30 がビタミン C 生合成経路に必須の酵素グルコノラクトナーゼ (GNL) [EC 3.1.1.17] であることを明らかにした (Kondo, Y. et al., *PNAS*, 2006)。ヒトは、ビタミン C 生合成の最終酵素に変異が入っているためビタミン C を合成できない。しかし、マウスやラットは正常に合成できる。一方、我々が開発した SMP30/GNL ノックアウト (KO) マウスは、ビタミン C を合成できず、コラーゲン重合の低下による骨形成不全 (Kondo, Y. et al., *PNAS*, 2006) や皮膚の薄化 (Arai, YK. et al., *BBRC*, 2009) 等のビタミン C 欠乏症状 (壊血病) を呈する。さらに、私たちは、ビタミン C 欠乏マウスの脳 (Kondo, Y. et al., *BBRC*, 2008) および肺 (Koike, K. et al., *Am.J.Physiol. Lung Cell Mol.Physiol.*, 2010)、胃、小腸、精巣、膵臓、心臓、足底筋、平目筋、腎臓、肝臓における活性酸素種の生成は、顕著に増加することを明らかにした。また、壊血病にならない少量のビタミン C を与えて飼育した SMP30/GNL-KO マウスは、体重の増加率が低く、平均寿命は短縮 (Ishigami, A. et al., *BBRC*, 2004) 早期に加齢性難聴を来すことを報告した (Kashio, A. et al., *BBRC*, 2009)。死亡時の解剖所見から、炎症やガンといった疾患は認められず、臓器の委縮などヒトの老衰に似た症状を呈していた。

興味深いことに、私たちは、RT-PCR 法及びウェスタン法、免疫組織化学染色から、SMP30/GNL がビタミン C を体内で合成できないヒトにおいても発現していることを見出した。また、ヒト SMP30/GNL を高発現させた HepG2 細胞 (ヒト肝癌由来細胞、ビタミン C 合成能欠損) は、活性酸素種が減少した (Handa, S. et al., *Biol.Pharm. Bull.*, 2009)。さらに、ビタミン C を十分に投与して飼育した SMP30/GNL-KO マウスは、高脂肪食及び通常食での飼育条件下、膵臓からのインスリン分泌が低下し、耐糖能が悪化することを明らかにした (Hasegawa, G. et al., *Endocrinology*, 2010)。従って、SMP30/GNL は、ビタミン C 合成以外の未知の分子機能を有すると考えられるが、未だ明らかではない。

## 2. 研究の目的

ペントースリン酸経路は、グルコース 6-リン酸をグルコノラクトン 6-リン酸、6-ホスホグルコン酸を経て、グリセルアルデヒド 3-リン酸へと代謝する。同経路は、NADPH および核酸原料の供給を担っている。近年、同経路の代謝酵素遺伝子は、微生物からヒトに至るまで同定された。しかし、興味深いこと

に、KEGG (生命システム情報統合データベース) 等に記載されているペントースリン酸経路には、グルコースを起点として、グルコノラクトン、グルコン酸、6-ホスホグルコン酸に至る副経路が存在する。ただし、同副経路は、細菌類で一部が同定されているだけであり、動物において代謝物及び代謝酵素が存在するかどうかは全く不明である。主因は、生体組織におけるグルコノラクトン及びグルコン酸の定量法が確立されていないこと、グルコン酸を 6-ホスホグルコン酸にリン酸化するグルコン酸キナーゼ [EC 2.7.1.12] 遺伝子が未同定なことである。

私たちは、過去の研究から SMP30/GNL の基質特異性は広く、種々のアルドノラクトンの分解活性を示すことに注目した (Kondo, Y. et al., *PNAS*, 2006)。特に、グルコースから酵素的及び非酵素的に酸化されて生ずるとされるグルコノラクトンに対して、高い  $V_{max}$  値を示した。また、SMP30/GNL-KO マウスの肝臓において、同分解活性は認められなかった。従って、SMP30/GNLこそが、同副経路で働くグルコノラクトナーゼであると考えられる。

本研究では、動物におけるペントースリン酸副経路の全容を明らかにするため、ヒトおよびマウスにおけるグルコン酸キナーゼ遺伝子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) cDNA クローニング

候補遺伝子の cDNA は、ヒトおよびマウスの肝臓から mRNA を抽出して cDNA ライブラリーを調製、各遺伝子の全長を挟むよう設計したプライマーで PCR により増幅した。得られた cDNA は、塩基配列を確認後、大腸菌用プラスミドベクター pENTR/SD/D-TOPO に相同組換えにより挿入し、大腸菌を形質転換した。

### (2) 組換えタンパク質の作製

N 末端に 6×His を融合した組換えタンパク質は、候補遺伝子 cDNA を pCold ベクターに組換えて大腸菌に形質転換した後、15 で 24 時間培養して大量発現させた。組換えタンパク質は、大腸菌可溶性分画から、Ni-NTA agarose カラムおよび DEAE-Sephacel カラムを用いて精製した。

### (3) グルコン酸キナーゼ活性

グルコン酸キナーゼ活性は、カップリング反応により測定した。すなわち、基質の D-グルコン酸は、ATP および  $Mg^{2+}$  イオン存在下、グルコン酸キナーゼにより 6-ホスホ-D-グルコン酸になる。生成した 6-ホスホ-D-グルコン酸は、NADP<sup>+</sup> および 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼにより、D-リブロース 5-リン酸と NADPH、CO<sub>2</sub> に変換される。37 で 30 分間反応させて、生成した NADPH のもつ 340 nm の吸光度をモニターした。生成した

NADPH 量は、NADPH の検量線から算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) グルコン酸キナーゼ遺伝子の cDNA クローニング

NCBI の BLAST 検索の結果、グラム陰性桿状腐生性土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 におけるグルコン酸キナーゼ遺伝子のアミノ酸配列は、ヒトおよびマウスでの候補遺伝子 chromosome 9 open reading frame 103 (C9orf103) および RIKEN cDNA 5133401N09 gene (5133401N09Rik) (GenBank accession no.NM\_001001551 および NM\_198004) のアミノ酸配列とそれぞれ 70% および 69% の相同性を示した。そこで、ヒトおよびマウスの肝臓における cDNA ライブラリーより、各遺伝子の全長を含む cDNA を PCR で増幅し、プラスミドベクター pENTR/SD/D-TOPO に相同組換えにより挿入し、大腸菌を形質転換した。得られた cDNA の塩基配列は、シーケンス解析の結果、データベースの塩基配列と完全に一致した。

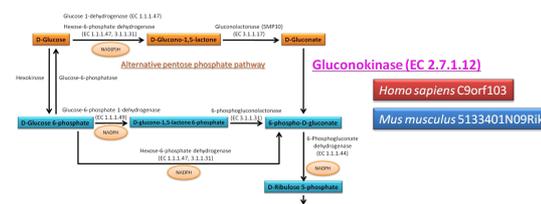
##### (2) グルコン酸キナーゼ組換えタンパク質の作製

ヒトおよびマウスのグルコン酸キナーゼタンパク質の N 末端に 6×His を融合した組換えタンパク質 (6xHis-hGNK および 6xHis-mGNK) は、候補遺伝子を pCold ベクターに組換えて大腸菌 BL21 を形質転換した後、15 で 24 時間培養して発現させた。大腸菌の可溶性分画および不溶性分画を SDS ポリアクリルアミド電気泳動および CBB 染色した結果、可溶性分画は不溶性分画に比べて多量の発現が認められた。そこで、大腸菌培養液 1 L の可溶性分画を nikel-nitriilotriacetic acid agarose と混合後、150 mM imidazole を含むバッファーで溶出した。さらに、溶出分画は、DEAE-Sephacel カラムにアプライし、0-0.5 M NaCl の濃度勾配をかけて溶出した。6xHis-hGNK および 6xHis-mGNK の溶出ピーク分画を SDS ポリアクリルアミド電気泳動および CBB 染色した結果、それぞれ予想される 22.0 kDa および 21.4 kDa の単一バンドが認められた。タンパク質量は数 mg であり、純度 95% 以上に精製することに成功した。

##### (3) 6xHis-hGNK および 6xHis-mGNK 組換えタンパク質のグルコン酸キナーゼ活性

精製した 6xHis-hGNK および 6xHis-mGNK 組換えタンパク質は、Mg<sup>2+</sup> イオン存在下において、用量依存性にグルコン酸キナーゼ活性を示した。比活性は、それぞれ 3.2 および 3.9 μmol/min/mg protein であった。また、マウスの肝臓粗抽出液を用いてグルコン酸キナーゼ活性を測定した結果、用量依存性に活性が認められた。以上の結果から、ヒトおよびマウスにおけるグルコン酸キナーゼ遺伝子は、それぞれ chromosome 9 open reading frame 103 (C9orf103) および RIKEN cDNA 5133401N09

gene (5133401N09Rik) であると同定された。本研究により、ヒトおよびマウスにおけるペントースリン酸副経路の存在が示唆される。



#### 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 3 件)

1. Kondo, Y., Masutomi, H., Noda, Y., Ozawa, Y., Takahashi, T., Handa, S., Maruyama, N., Shimizu, T., and Ishigami, A. : Senescence marker protein-30/Superoxide dismutase 1 double knockout mice exhibits increased oxidative stress and hepatic steatosis. FEBS Open Bio 4, 522-532 (2014) 査読有 DOI: 10.1016/j.fob.2014.05.003
2. Kagami, Y., Kondo, Y., Handa, S., Maruyama, N., and Ishigami, A. : Senescence marker protein-30 (SMP30)/gluconolactonase (GNL) expression in the mouse ovary during gestation. Biol. Pharm. Bull. 36(12), 2005-2008 (2013) 査読有 DOI: 10.1248/bpb.b13-00309
3. Kondo, Y., Hasegawa, G., Okada, H., Senmaru, T., Fukui, M., Nakamura, N., Sawada, M., Kitawaki, J., Okanou, T., Kishimoto, Y., Amano, A., Maruyama, N., Obayashi, H., and Ishigami, A. : *Lep<sup>db/db</sup>* mice with senescence marker protein-30 knockout (*Lep<sup>db/db</sup>Smp30<sup>Y/-</sup>*) exhibit increases in small dense-LDL and severe fatty liver despite being fed a standard diet. PLoS ONE 8(6), e65698 (2013) 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0065698

[学会発表] (計 3 件)

1. 近藤嘉高、長谷川剛二、千丸貴史、福井道明、中村直登、丸山直記、尾林博、石神昭人: SMP30 を欠損した *Lep<sup>db/db</sup>* マウスは small dense LDL が高く脂肪肝を呈する。第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.4
2. 近藤嘉高、半田節子、丸山直記、石神昭人: ペントースリン酸副経路で働くヒトおよびマウスにおけるグルコン酸キナーゼの同定。第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013.9.13
3. 近藤嘉高、半田節子、野田義博、丸山直記、清水孝彦、石神昭人: *Smp30/Sod1* ダブルノックアウトマウスにおける脂質代

謝異常の解析. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012.12.16

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.aging-regulation.jp/>

東京都健康長寿医療センター研究所 分子老化制御

[http://www.tmghig.jp/J\\_TMIG/kenkyu/team/bunshiroukaseigy.html](http://www.tmghig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/bunshiroukaseigy.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 嘉高 (KONDO YOSHITAKA)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 20507397

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者