

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号： 31305

研究種目： 新学術領域研究

研究期間： 2009～2011

課題番号： 212000069

研究課題名（和文） 酸化ストレス感知とレドックス細胞制御機構の解析

研究課題名（英文） Study on sensing of oxidative stress and redox cell signaling

研究代表者

久下 周佐 (KUGE SHUSUKE)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号： 50186376

研究成果の概要（和文）：細胞内外で発生する活性酸素種は、過剰な場合は細胞にダメージを与えたり細胞死を誘導したりするため、様々な病気の発症への寄与が考えられている。一方で少量の活性酸素種は細胞増殖を促進する。では、細胞死と細胞増殖という異なった方向性（細胞の運命）はどのように決定されているのであろうか？本研究では、これまで抗酸化蛋白質と考えられてきたペルオキシレドキシンが活性酸素種の受容体として働き、酸化ストレスに応答した糖代謝や蛋白質合成の制御を行うことを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Reactive oxygen species (ROS) is generated outside and inside the cells. An excess level of ROS results in damages on cells and cell death, which may cause various pathologic processes. By contrast, a lower level of ROS rather activates cell viability and growth. Cellular signaling involved in how the distinct effects of ROS is unsolved. Here, we identify peroxiredoxin proteins, which are known to be antioxidant protein, can act as sensor for ROS and have ability to regulate the glucose metabolism and the translational reprogramming.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
総計	22,600,000	6,780,000	29,380,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞内情報伝達

キーワード：酸化ストレス、レドックス、感知、過酸化水素、eIF2 $\alpha$ リン酸化、ペルオキシレドキシン

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素種はミトコンドリア呼吸鎖やNADPH オキシダーゼ等により細胞内外で発生する。過剰の活性酸素種は、細胞にダメージを与えたり細胞死を誘導したりするため様々な病気の発症に関与する。一方で少量の活性

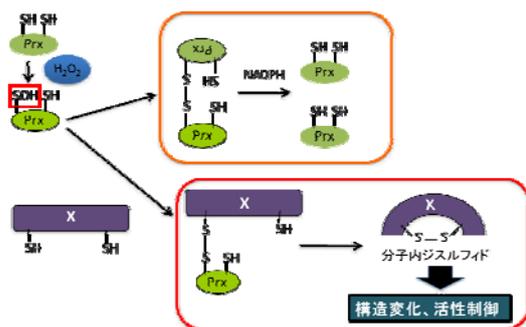
酸素種は増殖因子の信号を受け取ると発生し細胞増殖を促進する。では、細胞死と細胞増殖という異なった方向性（運命）はどのように決定されているのであろうか？

活性酸素種には主に酸素の一電子還元体であるスーパーオキシドおよび過酸化水素が挙

げられる。最近、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) がミトコンドリア由来の活性酸素種シグナルに必要であるという研究成果が報告された。これはミトコンドリア由来のスーパーオキシドが SOD により過酸化水素に変換されることが必須であること、すなわち過酸化水素が活性酸素種シグナルの主要分子であることを示唆している。過酸化水素は比較的安定で膜透過性が高いことから、過酸化水素を感知する機構およびそれをシグナルへと変換する機構を理解することが、活性酸素による細胞制御機構の解明に必須であろう。

研究代表者らは、過酸化水素によるストレス応答の研究が進んでいる出芽酵母をモデル真核生物としてこの問題に取り組んできた結果、ペルオキシレドキシシンと呼ばれる抗酸化蛋白質が過酸化水素の感知に機能する可能性を示唆してきた。ペルオキシレドキシシンは過酸化水素を受容 (一過的に酸化) するのみならず、標的蛋白質の酸化 (ジスルフィド結合) を触媒し、その標的蛋白質の活性を制御するという機構である (図 1、Okazaki, et al. *Antioxid. Redox Signal.* 2005)。一方、標的蛋白質のジスルフィド結合形成とその交換反応がターゲット分子の活性のレベルと持続性を制御することを見出した (Okazaki, et al. *Molecular Cell*, 2007)。これらの成果より、研究代表者らは、抗酸化因子と認識されてきたペルオキシレドキシシンファミリー蛋白質には、過酸化水素受容体 (レセプター) および標的蛋白質にジスルフィド形成を誘導しその機能制御を行うトランスドューサーとしての機能も持ち合わせる可能性を考えた。

図1. ペルオキシレドキシシンPrx抗酸化活性と標的分子(X)の制御



過酸化水素は蛋白質のシステイン残基を不可逆的に酸化 (過酸化) するが、このモデルではレセプターを介することで標的蛋白質に可逆的な制御 (チオール—ジスルフィド酸化還元によるレドックス制御) を可能とする。

ペルオキシレドキシシンは出芽酵母で 5 種、ヒトで 6 種のファミリーを形成している。そこで、まず特定のペルオキシレドキシシンと相

互作用する因子を同定し、その中に細胞の生死に関わる因子が存在すれば、過酸化水素による細胞増殖、生存・死の制御機構のカスケードの理解につながると考えた。

#### (1) 酵母ペルオキシレドキシシンと代謝制御

研究代表者らは酵母主要ペルオキシレドキシシン Tsal に相互作用する因子をスクリーニングして糖代謝の律速酵素であるピルビン酸キナーゼ (Pyk1) を同定した。ピルビン酸キナーゼはグルコース代謝の最終段階の律速酵素でピルビン酸合成を担う。

#### (2) ヒトペルオキシレドキシシンによるストレス応答と生存制御

ヒトペルオキシレドキシシン 5 (Prdx5) に相互作用する因子としてアポトーシスの制御を担うとされる蛋白質ヒト BAG1 を同定した。BAG1 は、GADD34 と相互作用することで、ストレス下における蛋白質の合成制御とストレスに必要な因子を合成誘導する可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究では過酸化物質の受容体とそれをシグナルに変換し細胞応答へと結びつける感知分子の同定、およびそれらの分子連関機構の解明を目指す。これまで研究代表者らが蓄積してきた知見は、ペルオキシレドキシシンが過酸化水素受容体として機能する可能性、さらにそれぞれのペルオキシレドキシシンが作用するターゲット因子の存在を示唆している。そこで、ペルオキシレドキシシンファミリー蛋白質—特異的ターゲット分子 (受容体—感知分子) がどのように絡み合っ細胞応答につながっているかを解析することで、シグナル分子としての過酸化水素の位置づけを明確にする。この目的で次の 2 つの研究を推進した。

#### (1) ペルオキシレドキシシンと代謝制御

酵母主要ペルオキシレドキシシン Tsal に相互作用するピルビン酸キナーゼ (Pyk1) の Tsal 依存的な制御機構の解明を目指した。

#### (2) ヒトペルオキシレドキシシンによるストレス応答と生存制御

ヒトペルオキシレドキシシン 5 (Prdx5) の標的として同定した BAG1 に相互作用する因子 GADD34 の活性制御機構の理解を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) および (2) の両者の実験に関して次の点に着目して研究を進めた。

- ・過酸化水素によるペルオキシレドキシシン (Tsal, Prdx5) 依存的なターゲット分子 (Pyk1, BAG1) のジスルフィド結合形成過程を、酸化還元反応の試験管内再構成系で確認した。

・ジスルフィド結合形成によりターゲット分子の活性制御が起こるか (Pyk1) を酸化還元試験管内再構成系を用いて検討した。また、酸化還元による細胞内の BAG1-GADD34 相互作用の変化を観察した。

・ペルオキシレドキシニン - ターゲット分子間の制御が与える形質 (代謝変化やストレス抵抗性) の変化を検討した。

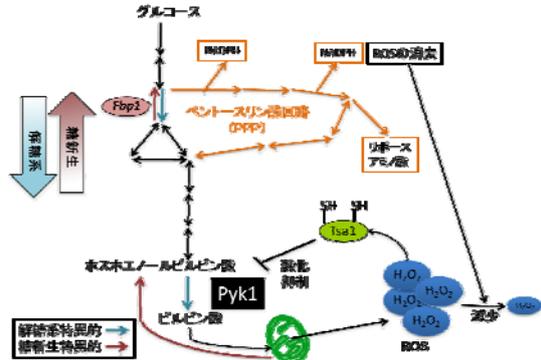
#### 4. 研究成果

##### (1) 酵母ペルオキシレドキシニンと代謝制御

5種類の酵母のペルオキシレドキシニンの中でTsa1は主要分子で総ペルオキシレドキシニンの90%以上を占める。Tsa1の触媒システイン残基に結合する分子として得られたPyk1の活性がTsa1依存的に制御されるか検討した。ピルビン酸キナーゼPyk1は糖代謝の最終段階で、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) よりピルビン酸合成を行う不可逆的な反応を触媒する。これは糖代謝とエタノール合成やTCA回路を仲介・制御するステップであり、その活性はグルコースが存在するときはフルクトース-1-, 6-ビスリン酸のレベルによる正のアロステリック制御をうける。一方、グルコースが枯渇した場合TCA回路のオキサロ酢酸を材料としてPEPを合成し糖新生につなげる。糖新生はNADPHおよび核酸等の代謝産物を得るために必要な経路であるため、糖枯渇時の細胞増殖およびNADPHを使用する脂質の合成や活性酸素種の除去し細胞内の還元状態を維持するためには必要な経路である。糖新生はPEPから糖代謝と逆反応を進めるため、PEPをピルビン酸に変換するPyk1の活性は抑制する必要がある。しかし以外にもPyk1の抑制機構は明らかにされていない。本研究の成果はこの疑問に答えを導き出すものである。すなわち、Pyk1はTsa1の存在下で過酸化水素によりジスルフィド結合を起こし活性抑制することが判明した。このPyk1制御機構の生理的意義を遺伝学的に解析した。Pyk1の活性抑制 (ジスルフィド結合形成) に必要なシステイン残基を同定した。次にそのシステイン残基をアラニンに変換したPyk1CA変異体と野生株の糖枯渇時の有機酸メタボローム比較を行ったところ、野生株に比べてPyk1CA変異株の糖新生は低下していた。また、糖枯渇時の過酸化水素抵抗性は野生型PYK1酵母株よりPYK1CA遺伝子を持った酵母株のほうが感受性であることが判明した。野生株の過酸化水素感受性の違いにはTsa1が必要であること、また糖新生に必要なFBP1が必要であった。本研究により、Pyk1が酵母ペルオキシレドキシニンTsa1依存的にレドックス抑制 (酸化還元による制御) されるこ

とが初めて示され、糖枯渇時の酸化ストレス応答機構に糖代謝・糖新生の制御が必寄与することを初めて明らかにした (図2 論文投稿準備中)。

図2 ペルオキシレドキシニンTsa1によるピルビン酸キナーゼ制御



##### (2) ヒトペルオキシレドキシニンによるストレス応答と生存制御

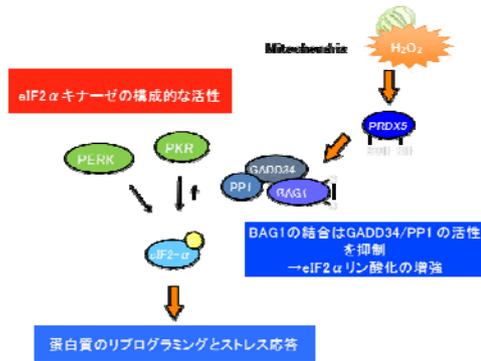
(PRDX5依存的BAG1のレドックス制御によるeIF2αのリン酸化制御機構)

小胞体ストレスやウイルス感染を防御するために、哺乳動物細胞はグローバルなタンパク質合成を阻害しストレス応答に必要な因子の蛋白合成を促進する (蛋白質合成のグローバルプログラミング)。これは翻訳開始因子eIF2αのリン酸化と活性抑制を介して起こる。小胞体ストレスやウイルス感染は、PARKやPKRと呼ばれるeIF2αリン酸化酵素が活性化されることが報告されている。しかし酸化ストレスにより活性化されるeIF2αキナーゼは存在しないことから過酸化水素によるeIF2αのリン酸化誘導機構は明らかになっていない。

本研究は、ヒトペルオキシレドキシニン5 (PRDX5) によりBAG1にジスルフィド結合形成が起こることを初めて示した。BAG1に相互作用する因子の中にGADD34が挙げられる。GADD34は脱リン酸化酵素PP1の制御サブユニットであり、GADD34/PP1はリン酸化eIF2αの脱リン酸化を行う。興味深いことに、BAG1がGADD34/PP1に結合するとGADD34/PP1の活性が抑制されることが報告されていた。本研究ではPRDX5依存的なBAG1のジスルフィド結合形成がBAG1とGADD34の結合を促進しGADD34/PP1活性が抑制されることがリン酸化eIF2αレベルの上昇につながることを明らかにした。PKRやPERKなどは非ストレス下においても弱い活性を示し低レベルのリン酸化eIF2αを維持するが、酸化ストレスの場合はこれらのリン酸化酵素の活性を変えないことなく、脱リン酸化活性の抑制することで結果的にリン酸化eIF2αレベルを増加させると考えられた (図3、論文投稿準備中)。これは酸化ストレス応答においてはこれまで知られていなかった新た

な翻訳リプログラミング機構が役割を果たすことを初めて示すものである。

図3. ヒトペルオキシレドキシシンPrx5によるGADD34/PP1の制御



以上、本研究課題の成果は酵母主要ペルオキシレドキシシン Tsa1 およびヒトペルオキシレドキシシン 5 が過酸化水素の受容体として機能し、それぞれの標的分子である Pyk1 および BAG1 をレドックス制御することを示しており、これまで抗酸化因子として認識されてきたペルオキシレドキシシンには、過酸化水素をシグナルに変換するという新たな能力があることを示唆するものである。また、Pyk1 の制御が酸化ストレス応答に糖新生の制御が寄与していること、および BAG1 の制御が酸化ストレスによるグローバルな翻訳リプログラミングに寄与することは、シグナル分子としての過酸化水素が細胞応答へと結びつく機構解明につながる研究成果である。蛋白質翻訳のリプログラミングや糖代謝制御は、糖尿病などの生活習慣病や癌などの病態と密接にかかわり、活性酸素種とこれらの病態との関わりを理解するために重要な知見を与え、今後、これらの病態の制御を目指した新たな創薬のターゲットになる可能性を示唆している。

他のペルオキシレドキシシンファミリー分子にも着目して、特異的ターゲット分子の同定と解析を行うことで、過酸化水素と細胞応答の分子機構の全容が明らかになっていくことが期待される。

##### 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 7 件)

- ① Kubota N, Inayoshi Y, Satoh N, Fukuda T, Iwai K, Tomoda H, Kohara M, Kataoka K, Shimamoto A, Furuichi Y, Nomoto A, Naganuma A, Kuge S, HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells. FEBS Letters, 査読あり, in press, DOI 10.1016/j.febslet. 2012. 05. 023 (2012)

- ② Iwai K, Kuge S. 活性酸素の感知とシグナル伝達機構, 東北薬科大学研究誌 Journal of Tohoku Pharmaceutical University, 査読なし, 57, 41-45 (2010).

- ③ Yano T, Oku M, Akeyama N, Itoyama A, Yurimoto H, Kuge S, Fujiki Y, Sakai Y., A novel fluorescent sensor protein for visualization of redox states in the cytoplasm and in peroxisomes. Molecular and Cellular Biology, 査読あり, 30, 3759-3766, MCB.00121-10 [pii] 10.1128/MCB.00121-10 (2010)

- ④ Hwang GW, Tobita M, Takahashi T, Kuge S, Kita K, Naganuma A. siRNA-mediated AMPKα1 subunit gene PRKAA1 silencing enhances methylmercury toxicity in HEK293 cells. Journal of Toxicological Science, 査読あり, 35, 601-604, JST.JSTAGE/jts/34.413 [pii] (2110)

- ⑤ Iwai K, Naganuma A, Kuge S., Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkylhydroperoxides to induce disulfide bond formation in the Cad1 transcription factor. Journal of Biological Chemistry, 査読あり, 285, 10597-10604, M109.090142 [pii] 10.1074/jbc.M109.090142 (2010)

- ⑥ Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A, Kuge S. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. Journal of Biological Chemistry, 査読あり, 284, 4464-4472, M807583200 [pii] 10.1074/jbc.M807583200 (2009)

- ⑦ Hwang GW, Wada N, Kuge S, Naganuma A., Overexpression of the novel F-box protein Ymr258c confers resistance to methylmercury in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Toxicological Science, 査読あり, 284, 413-416, JST.JSTAGE/jts/34.413 [pii] (2009)

[学会発表] (計 31 件)

- ① Shusuke Kuge, Hayato Irokawa, Kenta Iwai, Ayako Ogasawara, Toshihiko Watanabe. Peroxiredoxin and redox signaling. The 6<sup>th</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012年7月19日
- ② Hayato Irokawa, Ayako Ogasawara, Toshihiko Watanabe, Takumi Ohdate, Kenta Iwai, Shusuke Kuge. Peroxiredoxin mediated Redox

- regulation of gluconeogenesis and oxidative stress in yeast. The 6<sup>th</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012年7月20日
- ③ 岩井健太、久下周佐、酸化ストレスによる AKT1 の酸化と活性化機構の解析、日本生化学会東北支部 第 78 回例会、2012年5月26日、山形
  - ④ 色川隼人、小笠原綾子、渡部俊彦、大館巧、岩井健太、久下周佐、ペルオキシレドキシシン Tsal による糖新生のレドックス制御と酸化ストレス防御機構、日本生化学会東北支部 第 78 回例会、2012年5月26日、山形
  - ⑤ 渡部俊彦、色川隼人、久下周佐、代謝変化時の活性酸素種産生とペルオキシレドキシシンの機能、日本生化学会東北支部 第 78 回例会、2012年5月26日、山形
  - ⑥ 岩井健太、久下周佐、ペルオキシレドキシシン 5 による低酸素応答のレドックス翻訳制御機構、日本薬学会第 132 年会、2012年3月30日、札幌 (口頭)
  - ⑦ 色川隼人、小笠原綾子、渡部俊彦、大館巧、岩井健太、久下周佐、ペルオキシレドキシシンによる糖新生のレドックス制御と酸化ストレス応答機構、日本薬学会第 132 年会、2012年3月30日、札幌(口頭)、【日本薬学会第 132 年会 学生優秀発表賞受賞】
  - ⑧ 佐藤直子、永沼章、久下周佐、細胞質に分布する蛋白質による小胞体内腔蛋白質の品質管理に与える影響、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、横浜 (ポスター)
  - ⑨ 岩井健太、久下周佐、ヒトペルオキシレドキシシン Prdx5 の細胞内 ROS シグナル受容体としての機能、第 34 回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、横浜 (口頭)
  - ⑩ 色川隼人、渡部俊彦、小笠原綾子、大館巧、岩井健太、久下周佐、酵母ピルビン酸キナーゼ Pyk1 のレドックス活性制御は活性酸素種産生と寿命延長を制御する、第 34 回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、横浜 (ポスター)
  - ⑪ 渡部俊彦、色川隼人、久下周佐、代謝変化時の活性酸素種産生とペルオキシレドキシシンの機能、第 34 回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、横浜、(ポスター)
  - ⑫ 渡部俊彦、色川隼人、久下周佐、代謝変化により発生する活性酸素種のペルオキシレドキシシンによる制御、第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台 (口頭)
  - ⑬ 岩井健太、柴田美奈子、間さやか、久下周佐、ペルオキシレドキシシンによる過酸化水素の感知と酸化ストレス応答 (リン酸化eIF2 $\alpha$  レベル) の制御、第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台 (口頭)
  - ⑭ 大館巧、井上善晴、久下周佐、ペルオキシソーム分裂を制御するPex11の多量体形成における酵母GPxの機能解析、第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台 (口頭)
  - ⑮ 色川隼人、渡部俊彦、小笠原綾子、大館巧、岩井健太、久下周佐、ペルオキシレドキシシンTsalによる解糖と糖新生のレドックススイッチ機構の解析、第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台 (口頭)
  - ⑯ 佐藤直子、菊池純一、柿沼秀明、久下周佐、小胞体表面に蓄積する蛋白質によるCOPII小胞体輸送とERADの阻害、第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台 (口頭)
  - ⑰ 小笠原綾子、橘剛、色川隼人、渡部俊彦、岩井健太、久下周佐、ピルビン酸キナーゼの酸化還元による制御機構の解析、第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台 (口頭)
  - ⑱ 岩井健太、柴田美奈子、間さやか、久下周佐、ペルオキシレドキシシンによる過酸化水素の感知と酸化ストレス応答 (リン酸化eIF2 $\alpha$  レベル) の制御、第77回日本生化学会東北支部例会、平成23年8月23日、仙台
  - ⑲ 久下周佐、橘剛、色川隼人、小笠原綾子、渡部俊彦、岩井健太、ペルオキシレドキシシンによるレドックスシグナルの感知と代謝制御、第77回日本生化学会東北支部例会、平成23年8月23日、仙台 (口頭)
  - ⑳ 岩井健太、柴田美奈子、間 さやか、久下周佐 (シンポジスト)、過酸化水素によるeIF2 $\alpha$  のリン酸化はペルオキシレドキシシンにより制御される、日本薬学会第131年会、平成23年3月30日、静岡
  - ㉑ 岩井健太、間 さやか、柴田 美奈子、久下周佐、酸化ストレスシグナル受容体としてのペルオキシレドキシシンPrdx5の機能、日本薬学会第131年会、平成23年3月30日、静岡
  - ㉒ 色川隼人、橘 剛、渡部俊彦、岩井健太、久下周佐、ペルオキシレドキシシンによるグルコース-エタノール代謝スイッチ制御、日本薬学会第131年会、平成23年3月29日、静岡
  - ㉓ 岩井健太、間 さやか、柴田美奈子、久下周佐、酸化ストレスシグナル受容体としてのヒトペルオキシレドキシシンPrdx5

の機能、第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会（口頭発表）、平成22年12月8日、神戸

- ②4 岩井健太、永沼 章、久下周佐、ペルオキシレドキシシンAhp1 による有機過酸化物の感知と転写因子Cad1 のジスルフィド形成誘導、酵母遺伝子フォーラム、平成22年9月15日、奈良
- ②5 Kenta Iwai, Akira Naganuma, Shusuke Kuge, Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkylhydroperoxidas to induce disulfide bond formation in the Cad1 transcription factor., The 3rd International Symposium on Protein Community., 平成22年9月12日、奈良
- ②6 Shusuke Kuge, Naoko Kubota, Yoshitaka Inayoshi, Naoko Satoh, Kenta Iwai., Down regulation of nascent core protein of hepatitis C virus by HSP90 inhibition., 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses., 平成22年9月11日、横浜
- ②7 久下周佐、橘 剛、岩井健太、永沼 章、酸化ストレスや代謝に応答したパーオキシレドキシシン誘導性レドックスシグナルの感知と伝達、第83回日本薬理学会、シンポジウム招待講演、平成22年3月16日、大阪
- ②8 稲吉康孝、久保田直子、永沼 章、久下周佐、酵母細胞内で発現したHCV コア蛋白質の分解はHSP90による抑制される、第32回日本分子生物学会年会、平成21年12月11日、横浜
- ②9 佐藤直子、菊地純一、柿沼秀明、永沼 章、久下周佐、ER に分布する HCV Core による ER ストレス誘導機構の解析、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 11 日、横浜
- ③0 久下周佐、橘剛、岩井健太、大賀拓史、永沼章、有機酸メタボロミクスによる糖代謝のレドックス制御機構の解析、第 32 回日本分子生物学会年会、ワークショップ「メタボロミクスが解き明かす代謝生物学」口頭発表、平成 21 年 12 月 9 日、横浜
- ③1 久下周佐、レドックスシグナルの感知・伝達機構、第 178 酵母細胞研究会例会、招待講演、平成 21 年 12 月 4 日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/bisei/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久下 周佐 (KUGE SHUSUKE)  
東北薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：50186376

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

岩井 健太 (IWAI KENTA)  
東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50590006

渡部 俊彦 (WATANABE TOSHIHIKO)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20240509

小笠原 綾子 (OGASAWARA AYAKO)

東北薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：70326726