

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570198

研究課題名（和文） グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素による酸化ストレス応答の制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of mechanisms to regulate oxidative stress response by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

研究代表者

森ヶ崎 進（MORIGASAKI SUSUMU）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：90242487

研究成果の概要（和文）：環境は絶えず変化しており、生物にとって、この環境変化をいち早く察知し防御する「危機管理能力」が、自己の命、ひいては種の維持に欠かせない機能である。本研究では、環境変化（ストレス）の情報を核へと伝えるシステムの解析および解糖系酵素の一つ GAPDH によるこの機能の制御を解析した。その結果、ストレス耐性および生存・増殖を司る二つの異なる情報伝達経路がこの酵素により制御されることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：As environmental conditions are always fluctuating, it is most important function for organisms to sense the changes and protect themselves. I, in this research, biochemically analyzed two signal transduction pathways that control stress resistance or proliferation/growth. Moreover, I elucidated function of a glycolytic enzyme GAPDH on the pathways. In conclusion, GAPDH has functions as a sensor of oxidative stress and a master regulator of adaptation to the stress conditions, in addition to the classical function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内情報伝達・タンパク質複合体・target of rapamycin

1. 研究開始当初の背景

生物の体内（細胞内）環境は一定に維持されている。一方、生物を取り巻く環境は刻一刻と変化する。生命維持のためには、環境変化（ストレス）を感知・応答し、新しい環境に適応することが重要になる。この適応機構は、（1）環境の変化によるダメージを最小限に抑え、（2）新たな環境に適した成長・

増殖戦略をとるという二段階で行われる。環境変化に対する適応機構の探求はヒトを含め地球上の生命が今後経験すると思われるより過酷な環境に耐え、生命を維持し続ける術を知る上で意義深い研究であると考えられる。また、酸化ストレスは癌、糖尿病、神経変性疾患などの疾病や老化との関連が示唆され、近年ストレス応答に関する研究は重要度が

増しており、本研究の成果は医学・薬学分野への応用、貢献が期待できる。こうした背景のもと、研究代表者は、分裂酵母を用い GAPDH が H₂O₂ によるストレス応答性タンパク質リン酸化酵素 (SAPK) 経路の活性化に関与することを見出し、報告した (図 1 ; Morigasaki *et al.*, *Mol. Cell*, 30 巻, 108, 2008; 森ヶ崎, 塩崎, *化学と生物*, 46 巻, 740, 2008)。また未発表ながら、本酵素が Target of rapamycin 複合体 2 (TORC2) 経路の制御に関与することを示唆する結果を得ていた。

ストレス耐性

SAPK 経路 : SAPK は MAP キナーゼ (MAPK) のサブファミリーのひとつで、分裂酵母の SAPK である Spc1 は動物細胞における p38 MAPK のホモログである。Spc1 は様々なストレスによって活性化され、転写因子 Atf1 による “core environmental stress response” 遺伝子群の転写を活性化するため、この経路はストレス耐性において中心的役割を演じていると考えられる。Spc1 の活性化はストレスの種類によって異なる調節を受ける。例えば、高浸透圧と H₂O₂ は二成分制御系のレスポンスレギュレータである Mcs4 依存的に Spc1 を活性化するが、二成分制御系の他の因子、Mak2, 3 および Mpr1 は H₂O₂ シグナリングにのみ応答する (Nguyen *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 11 巻, 1169, 2000)。そして、高浸透圧シグナルを Mcs4 に伝える仕組みは未解明である。

研究代表者は Spc1 の上流で働く MAPKKK である Wis4 と Win1 が Mcs4 とともに複合体 (MAPKKK 複合体=MTKC) を形成することを見いだした。そして、分裂酵母の GAPDH である Tdh1 がこの複合体に結合しており、活性中心のシステイン残基 (Cys¹⁵²) の酸化により H₂O₂ ストレスを感知し、Mpr1-Mcs4 間のシグナル伝達を促進することで Spc1 の活性化に寄与することを報告した (図 1 ; Morigasaki *et al.*, *Mol. Cell*, 30 巻, 108, 2008)。また、Tdh1 が高浸透圧ストレス下で MTKC から解離するという結果を得た (未発表)。

成長・増殖の制御

TORC2 経路 : Target of rapamycin (TOR) は真核生物に保存されたタンパク質リン酸化酵素であり、栄養素などに応答して細胞の生存、増殖、形態を調節する。TOR は細胞内で構造的、機能的に異なるふたつのタンパク質複合体 (TORC1, TORC2) を形成する。TORC1 は rapamycin 感受性であり、窒素栄養に応答し翻訳調節などを行う。一方、TORC2 に関してはインスリン刺激で Akt/PKB の疎水性領域をリン酸化すること (Sarbasov *et al.*, *Science*, 307 巻, 1098, 2005)、アクチン重

合を調節すること (Loewith *et al.*, *Mol. Cell*, 10 巻, 457, 2002) などの報告はあるが、直接上流で働く因子は同定されておらず、不明な点が多い。

研究代表者は、分裂酵母で①Akt のホモログである Gad8 の疎水性領域のセリン残基 (Ser⁵⁴⁶) のリン酸化が TORC2 に依存して起こる、②このシグナル伝達経路が H₂O₂、高浸透圧、高温条件下での生育に寄与する、③H₂O₂ ストレスで Gad8 が一時的にリン酸化・活性化する、という結果を得た (図 1 ; Ikeda *et al.*, *Cell Cycle*, 7 巻, 358, 2008; 一部未発表)。また、TORC2 構成因子をベイトにしたツーハイブリッド法により、Sin1 結合タンパク質として分裂酵母 GAPDH である Tdh1 を単離した (未発表)。

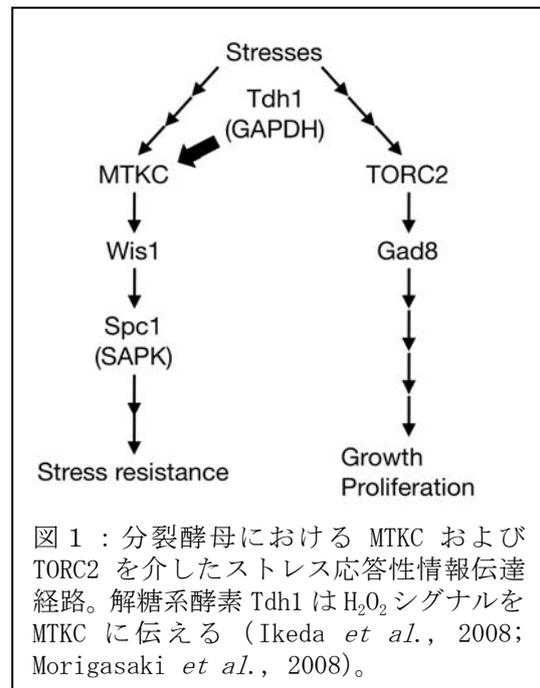


図 1 : 分裂酵母における MTKC および TORC2 を介したストレス応答性情報伝達経路。解糖系酵素 Tdh1 は H₂O₂ シグナルを MTKC に伝える (Ikeda *et al.*, 2008; Morigasaki *et al.*, 2008)。

2. 研究の目的

研究代表者は先行研究より、「GAPDH が酸化ストレス応答を制御する重要なタンパク質である」という考えに至った。このアイデアを検証するために ; (1) Tdh1 が TORC2 経路において H₂O₂ ストレスのセンサーとして働く、(2) Tdh1 が MAPKKK 複合体上で H₂O₂ と高浸透圧ストレスシグナリングの切り替えスイッチとして働く、という作業仮説をたてた。

本研究は、解糖系酵素である GAPDH(Tdh1) によるストレスシグナル伝達系の調節機構を理解することにある。

3. 研究の方法

(1) TORC2 経路の制御

TORC2 経路の活性測定 : *in vivo* における TORC2 経路の活性を Gad8 の疎水性領域のリン酸化レベルを指標に評価した。カリフォルニア大学デービス校の塩崎教授 (現奈良先端科学技術大学院大学教授) より譲り受けた抗リン酸化 Gad8 抗体を用い、ウェスタン解析により Gad8 のリン酸化レベルを測定した。Tdh1 と TORC2 経路の遺伝学的相関 (エピスタシス) の解析、新規 TORC2 経路の制御因子の探索などに用いた。

タンパク質間物理的相互作用の解析 : エピトープタグ法により、Tdh1 と TORC2 構成因子間の結合および TORC2 の構成因子間の物理的相互作用を解析した。後者は、*tdh1* 遺伝子破壊による影響を解析することで、Tdh1 の TORC2 の安定性への寄与を解析した。

以上の解析により、Tdh1 が TORC2 経路の調節因子である証拠を得ることを試みた。また、ストレス感受性および不撓性という表現型を利用し、新規 TORC2 経路の制御因子の探索を行った。

(2) MAPKKK 複合体の制御

ストレスにตอบสนองした SAPK 経路の活性化における MAPKKK 複合体 (MTKC) の役割を明らかにする目的で、生化学的および遺伝学的解析を行った。

SAPK 経路の活性測定 : *in vivo* における SAPK 経路の活性を抗リン酸化 Spc1 抗体によるウェスタン解析により測定した。抗体は塩崎教授より譲り受けた。

また、上記と同様の方法で、MTKC の構成因子間および Tdh1 と MTKC 間の物理的相互作用を解析した。

4. 研究成果

(1) TORC2 経路の制御

① Tdh1 による TORC2 経路の制御

TORC2 経路の活性の解析結果より、*tdh1* 遺伝子破壊 (*Δtdh1*) により、対数増殖期 (ストレスなし) におけるこの経路の活性がほぼ半減すること、および、細胞の H₂O₂ 処理による一時的な活性化が消失することを見いだした (表 1)。また、Tdh1 の H₂O₂ センサーである Cys¹⁵² をセリンに置換した変異タンパク質 (Tdh1CS) を発現する株におけるこの経路の活性は、ストレスなしの条件では野生株と同レベルであった一方で、H₂O₂ による活性化は検出されなかった。

これらのことは、Tdh1 が二つの異なる機構で TORC2 経路を制御することを示唆する：一

つは Cys¹⁵² に依存した H₂O₂ の情報を伝達する機構であり、二つ目は Cys¹⁵² に依存せず (恐らくは、Tdh1 のタンパク質自体の効果) この経路の活性を維持する機構である。

これに加えて、Tdh1 と TORC2 の構成因子である Sin1 の物理的相互作用を解析した結果、H₂O₂ 処理がこれらのタンパク質間の結合を強化すること、Tdh1CS は Sin1 と結合するが、この結合は H₂O₂ に応答しないことが判明した。これらことは、Tdh1 が TORC2 経路の直接の制御因子であることを示唆する。(学会発表⑦, ⑧, ⑨)

表 1 : Gad8 リン酸化レベル。

Strain	Phosphorylation level of Gad8	
	No stress	Activation by H ₂ O ₂
WT	1.00±0.11	+
<i>Δtdh1</i>	0.55±0.14	-
<i>tdh1CS</i>	0.94±0.19	-
<i>Δryh1</i>	0.21±0.05	-
<i>ryh1QL</i> (active form)	1.95±0.35	-
<i>ryh1QL Δtdh1</i>	1.27±0.07	-
<i>Δsin1</i>	ND	-

ND, 検出限界以下。

② TORC2 経路の新規制御因子の探索

TORC2 経路の機能欠損は高温、高浸透圧ストレスに対して感受性であり、不撓性を示す。Cancer Research UK の登田教授らにより、これらと一致する表現型を示す分裂酵母変異株 *sat1-11*, *sat4-86*, *sat7-110* が報告されていた (Kominami *et al.*, *EMBO J.*, 17 巻, 5388, 1998)。これら変異株を譲り受け、原因遺伝子を同定した結果、*sat7-110* は低分子量 GTPase である Ryh1 をコードする遺伝子 (*ryh1*) に、また、*sat1-11* および *sat4-86* は Ryh1 の活性化因子をコードする遺伝子にそれぞれ変異が入っていた。

さらに、解析を進め以下の結果を得た：

- TORC2 経路の機能欠損株が *ryh1* 破壊株 (*Δryh1*) 同様に液胞形成異常を示す。
- Δryh1*, *Δsat1* および *Δsat4* 株では Gad8 のリン酸化レベルが野生株の約 3 割に低下する (表 1)。
- 不活性型 Ryh1 が Sin1 と結合する。
- 不活性型 Ryh1 の過剰発現株では Sin1 と Gad8 の結合が抑制される。

この成果は論文として公表した。(雑誌論文①; 学会発表③, ④, ⑤)

③Tdh1 と Ryh1 間の相互作用

Tdh1 および Ryh1 が TORC2 経路の制御因子であることから、これらの因子間における協調的な制御機構の有無を解析した。その結果、これらの因子は異なる機構で TORC2 経路を制御することを示唆する結果を得た (表 1)。(学会発表①, ②)

(2) MAPKKK 複合体, MTKC の解析

H₂O₂ 以外のストレス、特に高浸透圧ストレス、に対する MTKC の応答に Tdh1 が関与するか否かを解析するためには、その前段階として、MTKC の生化学的解析が必要であると考えた。従って、まず、MTKC の生化学的解析を試みた。その結果、以下のことが判明した。

- MAPKKK である Wis4 および Win1 と制御因子である Mcs4 からなるヘテロ三量体がこの複合体のコアになっている。
- Mcs4 は MAPKKK とその基質である Wis1 との結合に必須である。
- キナーゼ活性は Wis4 あるいは Win1 のどちらかで十分である。
- Wis4 の欠損は Win1 で相補されない。その逆も同じ。

Wis4, Win1 はキナーゼドメインのアミノ末端側に約 1000 アミノ酸からなる非触媒領域を持つ。キナーゼドメインはお互いに相補できる(c)。このことは、このアミノ末端領域がヘテロであることが MTKC の機能に重要であることを示唆する。(学会発表⑥)

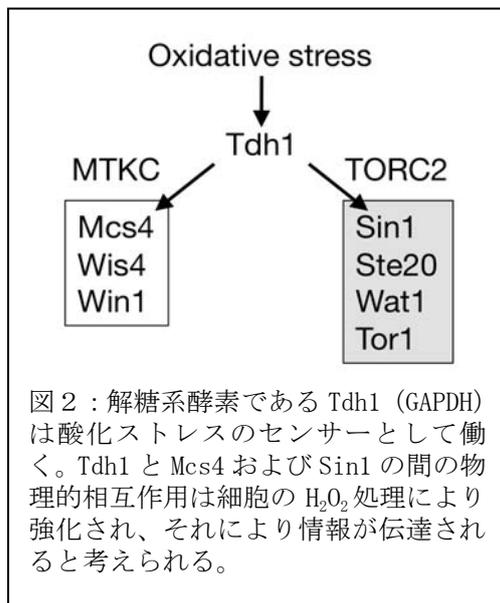


図 2 : 解糖系酵素である Tdh1 (GAPDH) は酸化ストレスのセンサーとして働く。Tdh1 と Mcs4 および Sin1 の間の物理的相互作用は細胞の H₂O₂ 処理により強化され、それにより情報が伝達されることが考えられる。

研究期間内に、ストレスに応答する二つの情報伝達経路 (SAPK および TORC2 経路) で働く高分子タンパク質複合体 (それぞれ MTKC および TORC2) の制御に関わる分子基盤を解析し、今後の研究の発展に寄与するデータを得ることができた。また、解糖系酵素である GAPDH (分裂酵母では Tdh1) が TORC2 経路を制御することを示唆する結果も得た (表 1)。

このことは、「GAPDH が酸化ストレス応答を制御する重要なタンパク質である」という仮説を支持する重要な知見である (図 2)。また、TORC2 の制御因子はどの生物種でも同定されておらず、本研究の過程で、TORC2 の制御因子として Tdh1 に加えて Ryh1 を同定したことは重要な成果である。

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 1 件)

①*Hisashi Tatebe, *Susumu Morigasaki, Shinichi Murayama, Cui Tracy Zeng, and Kazuhiro Shiozaki (*第一著者), Rab-family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast, *Current Biology*, 20巻, 1975-1982 (2010) 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 森ヶ崎進: Studies on a TORC2 regulation mechanism in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 第 3 4 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2011) 2011年12月16日 パシフィコ横浜 (横浜)

② 森ヶ崎進: 分裂酵母における Tdh1 と Ryh1 による TORC2 経路の制御機構の解析. 酵母遺伝学フォーラム第 4 4 回研究報告会 2011年9月6日 九州大学医学部百年講堂 (福岡)

③Susumu Morigasaki: Ryh1, an ortholog of mammal Rab6 small GTPase associates with and regulates the target of rapamycin complex 2. The sixth international fission yeast meeting (pombe 2011) 2011年6月28, 29日 (両日発表) Martin Conference Center (Boston, U. S. A.)

④森ヶ崎進: Regulation of the target of rapamycin complex 2 by a Rab-family small G-protein in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 第 8 3 回日本生化学会大会・第 3 3 回日本分子生物学会年会合同大会 (BMB2010) 2010年12月10日 神戸ポートアイランド (神戸)

⑤森ヶ崎進: 分裂酵母の低分子量型 G タンパク質 Ryh1 による target of rapamycin 複合体 2 経路の制御. 酵母遺伝学フォーラム第 4 3 回研究報告会 2010年9月9日 ならまちセンター (奈良)

⑥Susumu Morigasaki: Wis4-Win1 MAPKKK heteromer as a platform for stress signaling. The Fifth International Fission Yeast Meeting 2009年10月28日 国立オリンピック記念青少年総合センター

(東京)

⑦森ヶ崎進: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a modulator of the target of rapamycin complex 2 in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. 第82回日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸国際会議場・神戸国際展示場 (神戸)

⑧Susumu Morigasaki: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates hydrogen peroxide-stress signaling in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. 21st IUBMB and 12th FAOBBM International Congress of Biochemistry and Molecular Biology 2009年8月5日 Shanghai International Conference Center (Shanghai, China)

⑨森ヶ崎進: 分裂酵母Target of rapamycin複合体2を介した情報伝達系の解析. 酵母遺伝学フォーラム第42回研究報告会 2009年7月30日 ノバホール (つくば)

[図書] (計1件)

① Susumu Morigasaki and Kazuhiro Shiozaki: Elsevier Inc. (Academic Press), Methods in Enzymology, vol. 471, "Two-Component Signaling Systems, Part C" (Edit. by M. I. Simon, B. R. Crane, A. Crane) (2010) pp279-pp289

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森ヶ崎 進 (MORIGASAKI SUSUMU)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・研究員
研究者番号: 90242487