

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710222

研究課題名（和文）

一酸化炭素によるメチル化シグナルを介した新しい糖代謝リモデリング機構の解明

研究課題名（英文）

CO regulates directional biotransformation of glucose via protein arginine methylation.

研究代表者

山本 雄広 (YAMAMOTO TAKEHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50383774

研究成果の概要（和文）：ストレス誘導性ガスシグナルである一酸化炭素（CO）は活性酸素種に対して抗アポトーシス効果を持つことが知られていたが、機序は長らく不明であった。本研究では安定同位体標識グルコースを用いたメタボローム解析によって、CO 処理細胞では解糖系への flux が抑制され、ペントースリン酸回路への flux の増加が認められた。さらに CO の標的作用分子を精査したところ、PFK のアロステリック活性化因子である F-2,6-BP (Fructose-2,6-bisphosphate) の合成酵素 PFKFB3 のメチル化修飾が CO によって変化することで活性が阻害されることが示され、ペントースリン酸回路の活性化によって産生された NADPH は還元型グルタチオン量の維持に働き、抗ストレス作用として機能することが明らかになった。このように CO は PFKFB3 のメチル化を介して解糖系からペントースリン酸回路への糖代謝のリモデリングに作用し、還元力を維持されることで酸化ストレスに耐性をもつようにエネルギー代謝を制御する、新しい糖代謝制御系の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Carbon monoxide (CO) is a multifunctional gaseous mediators to regulate smooth muscle tonus, neurotransmission, intracellular metabolism, apoptosis, and proliferation. Since macromolecules possessing metal-centered prosthetic groups such as enzymes in metabolic systems might serve as targets for covalent binding of molecular oxygen or CO. Here, we provide the evidences that CO regulates directional biotransformation of glucose by metabolome flux analysis using stable isotope,  $^{13}\text{C}_6$ -labeled glucose, that is, CO suppress the flux into glycolysis, while increase the flux into pentose phosphate pathway (PPP) via protein methylation in human monoblastic cell line U937. Furthermore, we showed that glycolysis-promoting enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, isoform3 (PFKFB3), responsible enzyme for the production of fructose-2,6-bisphosphate (F-2,6-BP), was methylated by protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1). Administration of CO caused the demethylation of PFKFB3 and decreased the intracellular F-2,6-BP level, leading to inhibition of glycolysis. As a result, CO activates the flux into PPP, followed by the augmentation of NADPH, essential reducing cofactor mainly used for reduction of glutathione, hence PPP plays an important role in protection from oxidative stress-induced apoptosis. Thus, stress-induced CO acts cytoprotective effect by regulating metabolic shift of glucose utilization (glycolysis-PPP transition) against oxidative stress.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 総計      | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：一酸化炭素、メチル化、糖代謝、ペントースリン酸回路、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

ストレス誘導性ガス分子である一酸化炭素 (CO) は細胞内において、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、抗増殖作用など多彩な機能を発揮するシグナル伝達物質であるがその作用機序については不明な点が多い。研究開始当初、我々は CO が有する代謝調節物質としての機能を発見し、含硫アミノ酸代謝代謝中の酵素、cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) が CO の受容体として機能し、CO が CBS の活性を阻害することにより含硫アミノ酸代謝変動をもたらす、DNA やタンパク質へのメチル基転移反応に影響を与えることを見出した。さらに培養細胞系にてプロテオミクス技術を用いて CO により急性にメチル化修飾を受けるタンパク質を探索したところ、複数の糖代謝酵素がメチル化候補タンパク質として同定された。これらの糖代謝酵素群は解糖系およびペントースリン酸回路の分岐点およびその近傍に位置することから、ストレス応答性に産出された CO が標的分子のメチル化修飾を介して糖代謝のスイッチングに寄与し、糖利用をペントースリン酸回路へシフトさせることで還元力を維持し、活性酸素種依存性の抗アポトーシス作用を發揮するのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

本提案研究では上述の新規の糖代謝制御機構の存在を立証するために、メタボローム技術および生化学的手法を駆使してメチル化標的分子を同定し、メチル化修飾を介した新しい糖代謝制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究においては、以下の手法で研究を遂行した。

(1) 解糖系のメタボローム解析はヒト単球由来細胞 U937 を用い、安定同位体標識グルコースを培地中に 5 分間添加し、細胞を回収した。抽出した代謝物はキャピラリー電気泳動型質量分析装置で測定し、取り込まれたグルコースが解糖系とペントースリン酸回路でどれくらいの比率で代謝されたかを解析し、糖代謝中の CO の作用点を探索した。

(2) メチル化標的分子である PFKFB3 のメチル化部位を大腸菌リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* methylation 法により同定した。

(3) 細胞内における PFKFB3 のメチル化動態を調べるために、PFKFB3 メチル化ペプチドを抗原としたポリクローナル抗体を作製した。

(4) メチル化修飾による PFKFB3 の活性変化を調べるため、HEK293 細胞に野生型およびメチル化部位に変異を導入した PFKFB3 ベクターを導入した安定発現株を作製した。これらの細胞を用いて、PFKFB3 酵素活性および細胞内 NADPH 量、過酸化水素処理による細胞死の割合を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) CO による解糖系制御ポイントの探索

糖代謝における CO の作用点を探るため、安定同位体標識グルコースを用いたメタボローム解析をおこなったところ、対照群に比べ CO 処理細胞において解糖系への流量が減少し、ペントースリン酸回路への流量が増加が認められた。加えて、F-1,6-BP 以降のほとんどの代謝物量が減少していたことから、CO の解糖系抑制作用は解糖系の律速酵素 PFK にあるのではないかと推測した。事実、CO 処理した細胞ライセートでは PFK1 活性の低下が認められた。さらに精査したところ、CO 処理細胞では PFK1 のアロステリック活性化物質である F-2,6-BP の量が減少していたことから、CO の作用点は PFK 自身ではなく、F-2,6-BP の合成または分解にかかわる酵素あることが推測された。

### (2) 新規メチル化標的分子 PFKFB3 の同定

F-2,6-BP の生成・分解は PFK2 によって行われ、細胞内における F-2,6-BP 量によって解糖系の活性化が制御されている。PFK2 には発現組織の違いなどで 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, isoform (PFKFB) 1~4 の 4 種類が存在する。U937 細胞では PFKFB3 が優位に発現しておりこの酵素が F-2,6-BP 合成の責任酵素と考えられる。また、上述(1)の結果で CO による F-2,6-BP 量の低下は転写阻害剤アクチノマイシン D の存在下

においても認められたことから、CO の作用は、新たな PFKFB3 の転写を介するよりも翻訳後修飾に影響を与える可能性が考えられた。PFKFB3 の一次構造を調べてみると Arg-X-Arg というアルギニンメチル化酵素 PRMT1 (protein arginine methyltransferase 1) によるメチル化モチーフが認められたため、大腸菌リコンビナントタンパク質を用いた in vitro methylation assay を行なった。その結果、PFKFB3 は PRMT1 によって 131 番目と 134 番目のアルギニン残基がジメチル化される新規メチル化タンパク質であることを明らかにした。

### (3) CO による PFKFB3 のメチル化動態の変化

細胞内における PFKFB3 のメチル化動態を調べるため、メチル化型 PFKFB3 を特異的に認識するポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いた western blot をおこなったところ、未処理細胞内において PFKFB3 は既にメチル化状態にあるが、CO 処理や CO 合成酵素 HO-1 (heme oxygenase-1) の過剰発現細胞では PFKFB3 が低メチル化状態にある事を見出した。逆に HO-1 の活性欠損変異体導入細胞では PFKFB3 は高メチル化状態であった。これらの結果から PFKFB3 は細胞内の CO 濃度によってメチル化動態が変化することが明らかとなった。

### (4) メチル化修飾による PFKFB3 の活性調節

PFKFB3 がメチル化修飾されることにより、どのような変化が生じるのかを調べるために野生型およびメチル化部位に変異を導入した変異体 PFKFB3 (R131K/R134K) を HEK293 細胞へ導入し安定発現株を得たところ、野生型に比べ、非メチル化変異体導入細胞では、反応産物である F-2,6-BP 産生能が低く、ペントースリン酸回路への流入が多くみられ、過酸化水素に対しアポトーシス耐性を有することから、脱メチル化型 PFKFB3 ではメチル化型酵素に比べ酵素活性が低いことが考えられる。また、PFKFB3 は 142 番目のリジン残基がユビキチン化されることが報告されていたが、この K142 は同定したアルギニン残基と近接する。そこで野生株と HO-1 過剰発現株で PFKFB3 のユビキチン化動態を調べたところ、HO-1 過剰発現株では高度にユビキチン化されていることから、PFKFB3 のメチル化とユビキチン化は拮抗的に働き、メチル化型酵素は立体構造的にユビキチン化され難く、酵素タンパク質として安定であることが推測された。

以上の結果より、CO は CBS を介した含硫アミノ酸代謝調節により糖代謝酵素 PFKFB3 の

脱メチル化を惹起し、解糖系を抑制することでペントースリン酸回路への流量を増加させる。この糖代謝のリモデリングで生じた還元当量 NADPH により細胞はアポトーシス耐性を獲得するという、新しいモデルを提唱するに至った。

### 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 7 件 )

- (1) Hishiki T, Yamamoto T, Morikawa T, Kubo A, Kajimura M and Suematsu M. (2012) Carbon monoxide: Impact on remethylation and transsulfuration metabolism and its pathophysiologic implications. Journal of molecular medicine Vol.90, No.3, p245-254 ( 査読有 )
- (2) Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M, and Saya H. (2012) Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. Cancer Research Vol.72, p1438-1448 ( 査読有 )
- (3) 末松 誠、山本雄広、菱木貴子、加部泰明、梶村真弓 (2012) 「ガス分子による代謝システム制御機構の系統的探索と医学応用」実験医学 Vol.30 No.2 (増刊), 90-97 ( 査読無し )
- (4) Yamamoto T, Takano N, Ishiwata K, and Suematsu M. (2011) Carbon monoxide stimulates global protein methylation via its inhibitory action on cystathionine  $\beta$ -synthase. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition Vol.48, p96-100 ( 査読有 )
- (5) 末松 誠、菱木貴子、久保亜紀子、大村光代、梶村真弓、加部泰明、高野直治、山本雄広 (2011) 「ガス分子を介した代謝システム制御機構: 酸素とグルコースが紡ぐ複雑系」細胞工学 Vol.30, No.1, p10-19 ( 査読無し )
- (6) Takano N, Yamamoto T, Adachi T, and Suematsu M. (2010) Assessing a shift of glucose biotransformation by LC-MS/MS-based metabolome analysis in carbon monoxide-exposed cells. Advances in Experimental Medicine and Biology Vol.662, p101-107 ( 査読有 )

- (7) Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, **Yamamoto T**, and Suematsu M. (2010) Interactions of Multiple Gas-Transducing Systems: Hallmarks and Uncertainties of CO, NO, and H<sub>2</sub>S Gas Biology. Antioxidants & Redox Signaling Vol. 13, No.2, p157-192 ( 査読有 )

〔学会発表〕(計3件)

- (1) **山本雄広**、高野直治、石渡恭子、菱木貴子、長畑善子、末松 誠「一酸化炭素(CO)を介したアルギニンメチル化による糖代謝リモデリング機構の解析」第84回日本生化学会、2011年9月23日、京都市
- (2) **山本雄広**、高野直治、石渡恭子、末松 誠「一酸化炭素(CO)による糖代謝リモデリング機構の解析」第11回日本NO学会、2011年5月13日、町田市、東京
- (3) **山本雄広**、高野直治、石渡恭子、末松 誠「一酸化炭素(CO)による糖代謝リモデリング機構の解析」第83回日本生化学会 2010年12月7日、神戸市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gasbiology.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本雄広 (YAMAMOTO TAKEHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50383774