

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651235

 研究課題名（和文） 細胞内還元化を伴う窒素飢餓と疾患のレドックス可視化技術を用いた
情報伝達構解明

 研究課題名（英文） Elucidation of signaling pathway with visualization of redox state
during nitrogen starvation and diseases accompanying
intra-cellular reduction

 研究代表者 阪井 康能 (SAKAI YASUYOSHI)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：60202082

研究成果の概要（和文）：本研究課題においては、研究代表者らが開発した細胞内のレドックス状態をリアルタイムで可視化するセンサータンパク質、レドックスフロールを用い、細胞内の還元化をもたらすメカニズムについて、遺伝性疾患モデル細胞株や窒素源を含む栄養飢餓条件での酵母細胞を対象として解析した。その結果、ペルオキシソーム病モデル CHO 細胞で見られる細胞内還元化と極長鎖脂肪酸の量との関連を見出した。また、高温かつ飢餓条件下の酵母細胞の細胞内レドックスの還元状態の維持にチオレドキシニンが重要であることも見出した。

研究成果の概要（英文）：In this project we aimed to elucidate the mechanism of intra-cellular reduction in model cell lines of a hereditary disease or in yeast cells exposed to nutrient starvation (including nitrogen starvation), by utilizing a sensor protein of intra-cellular redox state termed Redoxfluor which we had developed. As a result we found that intra-cellular reduction observed in CHO cell lines of peroxisomal disease had a correlation with the level of very-long chain fatty acid. Furthermore, we discovered that thioredoxin proteins are important for the maintenance of cellular redox in yeast cells exposed to both heat stress and nutrient-deprivation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・ケミカルバイオロジー

キーワード：レドックス

還元化

ペルオキシソーム

FRET

チオレドキシニン

1. 研究開始当初の背景

本研究課題開始以前に私たちは、細胞内のレドックス状態変化を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の変化として示すセンサータンパク質レドックスフロールを開発し、これを用いてペルオキシソーム疾患モデル

細胞株における細胞内の還元化現象を見出していた。また、酵母細胞において、窒素源飢餓時にレドックス状態をつかさどる分子のひとつグルタチオン量の変動することが知られていたため、飢餓条件下での細胞内レドックス状態の変化が予想されていた。一方で

このようなレドックス状態変化をもたらす分子メカニズムはほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

(1) ペルオキシソーム疾患モデル細胞における細胞内還元化メカニズムの解析

ペルオキシソーム疾患モデル細胞株としてペルオキシソーム形成に機能する遺伝子 (PEX 遺伝子) 欠損株を用い、本細胞株での細胞内レドックス状態還元化をもたらす分子機構を解明する

(2) 飢餓条件での細胞内レドックス状態維持の分子機構の解析

窒素源飢餓をはじめとする飢餓条件における酵母細胞内のレドックス状態を把握し、その状態を規定する分子を探索する。

3. 研究の方法

(1) ペルオキシソーム疾患モデル細胞における細胞内還元化メカニズムの解析

PEX 遺伝子欠損 CHO 細胞株におけるレドックス関連低分子化合物の量を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析により比較した。またレドックスフロールを発現する正常 CHO 細胞に、ペルオキシソーム形成不全により代謝できなくなる脂質、極長鎖脂肪酸を継続添加し、その後細胞内レドックス状態を可視化解析した。

(2) 飢餓条件での細胞内レドックス状態維持の分子機構の解析

チオレドキシタンパクの還元活性に対するレドックスフロールの応答性を、精製したレドックスフロールおよびチオレドキシ、チオレドキシ再生システムを用いた生化学的解析により調べた。

レドックスフロールを発現させた酵母細胞株 (野生株およびチオレドキシ欠損株) を飢餓および高温ストレス条件にさらした後、その内部のレドックス状態の可視化解析を行った。また、同株の生存菌体数を計測比較した。

4. 研究成果

(1) ペルオキシソーム疾患モデル細胞における細胞内還元化メカニズムの解析

PEX 遺伝子欠損 CHO 細胞株から抽出された低分子化合物量を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析により比較した結果、還元型および酸化型のグルタチオンの量・比から規定される酸化還元電位について、正常株よりも PEX 遺伝子欠損 CHO 細胞株の方が低い (より還元的) であることを確認し、レドックスフロールを用いた可視化解析と一致した結果を得た。

次にレドックスフロールを発現する正常 CHO 細胞に対し経時的に極長鎖脂肪酸を添

加し培養した後、細胞内のレドックス状態をレドックスフロールによって可視化したところ、添加培養以前よりも細胞内レドックス状態が還元化することを見出した。この結果は前述の液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析によっても確認された。

これらの研究結果は以前に我々が見出していた、PEX 遺伝子欠損細胞における細胞内還元化のメカニズムを解明するために重要なものである。というのも PEX 遺伝子欠損によるペルオキシソーム形成不全がもたらす影響は多岐にわたり、どの要素が細胞内還元化をもたらすかについては謎であったのに対し、本結果から、候補要素の中でも極長鎖脂肪酸の代謝異常が細胞内の還元化につながる事が明らかとなったからである。今後は極長鎖脂肪酸の蓄積がもたらす低分子化合物メタボロームの変化や、遺伝子発現変動などを調べ、実際の細胞内還元化をもたらすアウトプットの詳細を把握することを企図している。

(2) 飢餓条件での細胞内レドックス状態維持の分子機構の解析

細胞内でグルタチオンとともに多くの酸化酵素への電子受容体としてはたらくチオレドキシは、酵母のストレス条件への耐性に重要な働きを担うことが報告されていた。本研究課題においてはまず、レドックスフロールがチオレドキシの還元力を検知しうるかどうかを検定するため、本センサータンパク質を大腸菌体発現させてから精製し、同様の方法で精製したチオレドキシ、およびその酸化型を還元型に戻す再生酵素などとともにインキュベーションした後レドックスフロール分子内の FRET 効率変化を蛍光スペクトル測定により追跡した。その結果、レドックスフロールはチオレドキシの濃度依存的に FRET 効率を上昇させ、還元化を示すことが明らかとなった。これまでの生化学的解析とあわせると、レドックスフロールは複数の活性酸素種、グルタチオンの酸化還元比の検知ができるのと同時に、チオレドキシの還元力も検知することから、細胞内においては、これらの複数の要素を包括した総合的なレドックス状態を指し示すことが明らかとなった。

次に上記のような生化学的性質の示されたレドックスフロールを、チオレドキシ欠損株に導入し、その FRET 効率を蛍光顕微鏡解析することで、細胞内レドックス状態を調べた。酵母の細胞質にはチオレドキシ 1 (Trx1) とチオレドキシ 2 (Trx2) という 2 つのチオレドキシが存在することが知られていた。そこでそれぞれのチオレドキシを失った株 (単独破壊株) に加え、両方のチオレドキシを失った二重破壊株も作成し

野生株との細胞内レドックス状態の差を比較した。興味深いことに通常の培養条件においてはこれらの破壊株内のレドックス状態は野生株とほぼ同じであることが分かった。

チオレドキシシン欠損により過酸化水素等の酸化剤に対する細胞耐性が弱まることは知られていたが、酵母が自然界で実際に受ける可能性の高いストレス、すなわち飢餓ストレスや高温ストレスに関してはその機能について不明な部分が多かった。そこでレドックスフローが導入された上記各株を、飢餓条件（培地を水に変換）高温条件（37℃）、およびその組み合わせ条件（37℃水中でインキュベーション）に置き、細胞内のレドックス状態を追跡観察し比較した。その結果、上記二重破壊株では高温ストレスのみで細胞内が野生型と比較し顕著に酸化状態になることが分かった。さらに高温と飢餓ストレスを組み合わせた条件下では、二重破壊株のみならず、Trx2の単独欠損株においても野生株と比較して細胞質が顕著な酸化状態になることを見出した。すなわち Trx2 が複合ストレス条件下で細胞内レドックスの還元化に寄与することが分かった。

チオレドキシシン欠損株において見出された細胞質の酸化が細胞の生存率と相関するかどうかを調べるため、上記使用株を高温・飢餓組み合わせ条件（37℃水中）でインキュベーションし、生存率の変化をコロニー形成数により追跡測定した。その結果、細胞質の酸化が見られた株（二重破壊株および Trx2 単独欠損株）においては、本条件で野生株と比較して顕著な生存率の低下が示された。このことは細胞内のレドックス状態と細胞生存率との密接な関係を強く示唆している。

以上の研究成果をあわせると、酵母細胞の細胞質にあるチオレドキシシンは、通常の培養状態ではレドックス状態の維持には必須ではないが、高温・飢餓ストレスにさらされた場合の細胞内レドックス状態の維持（酸化防止）に必要であることが分かった。このようなチオレドキシシンの生理学的機能は初めて見出されたものであり、酵母のみならず他の生物種においても同様の機能を持つことが考えられるため、今後の研究対象の拡大が期待される。また、チオレドキシシンが飢餓・高温条件でどのような抗酸化酵素の活性を支えているのか、さらに調べる必要がある。

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6件）

(1) M. Oku, Y. Ichiki, A. Shiraishi, T. Takahara, T. Maeda, Y. Sakai,

Hyper-activation of target of rapamycin (TOR) kinase 1 decreases intracellular glutathione content in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by LC-MS/MS analysis, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有、印刷中、2013

(2) 寶関 淳、奥 公秀、阪井康能、酵母のレドックス認識機構を応用した新しいセンサータンパク質の開発、*フレグランスジャーナル*、査読無、41巻、2013、64-69

(3) M. Oku, J. Hoseki, Y. Ichiki, Y. Sakai, A fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based redox sensor reveals physiological role of thioredoxin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 査読有、Vol.587、2013、pp.793-798 DOI: 10.1016/j.febslet.2013.02.003

(4) 阪井 康能、寶関 淳、奥 公秀、レドックス異常を回復する化合物レドックスモジュレーターの開発：Redoxfluorの創薬への利用、*遺伝子医学MOOK*、査読無、22巻、2012、158-163

(5) M.Okū, Y. Sakai, Assessment of physiological redox state with novel FRET protein probes, *Antioxidant and Redox Signaling*, 査読有、Vol.16、2012、pp.698-704 DOI : 10.1089/ars.2011.4251

(6) 奥 公秀、阪井 康能、Redoxfluorを用いた細胞内酸化還元状態の可視化、*実験医学*、査読無、29巻、2011、945-950

〔学会発表〕（計3件）

(1) 阪井 康能、生理的な細胞内レドックス状態を可視化するRedoxfluor、第54回日本植物生理学会年会シンポジウム～レドックス恒常性と制御～（招待講演）、2013年03月21日、岡山大学 津島キャンパス

(2) 阪井 康能、生理的な細胞内レドックス状態を可視化するFRETプローブとその生命、創薬科学への応用、第15回 Vitamin E Update Forum（招待講演）、2012年08月26日、東京都 如水会館

(3) 阪井 康能、生理的な細胞内レドックス状態を可視化するFRETプローブとその生命・創薬科学への利用、レドックスライフイノベーションシンポジウム（招待講演）、2012年3月9日、東京大学医学部

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.seigyo.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪井 康能 (SAKAI YASUYOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：60202082