



Possible Involvement of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Glucose Deprivation-Induced Activation of Transcription Factor Rst2

Kato, Toshiaki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5996号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005996>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Possible Involvement of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Glucose Deprivation-Induced Activation of Transcription Factor Rst2

低グルコース状態による転写因子 Rst2 の活性化に一酸化窒素・活性酸素種が関与する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
分子薬理・薬理ゲノム学
(指導教員：平井 みどり 教授)

加藤 俊明

【緒言】

グルコースはエネルギー源・炭素源として極めて重要な栄養素である。そのため、細胞は細胞内外のグルコース量を感じ、その量に応じて糖新生や解糖系などに関わる遺伝子の発現調節をおこないグルコースを一定量に保とうとする。モデル細胞である分裂酵母において、低グルコース状態で活性化する転写因子として Rst2 が知られている。Rst2 は STREP (stress response element of *Schizosaccharomyces pombe*) と呼ばれる転写調節領域に結合することで、糖新生などに関わる遺伝子群の発現調節を行っている。これまでに、Rst2 は高グルコース状態では PKA により直接リン酸化され、転写活性が抑制されることが知られている。しかし、低グルコース状態による Rst2 の活性化メカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、低グルコース状態による Rst2 の活性化メカニズムを解明するため、生細胞を用いた Rst2 の転写活性のモニタリングシステムを構築した。また、このシステムを使用し薬剤処理おこなった際の活性や遺伝子欠損株における活性を調べた結果、低グルコース状態による Rst2 の活性化に活性酸素種 (ROS)、および一酸化窒素 (NO) が関与する可能性が示唆されたので報告する。

【方法】

1. 使用した株、培養条件および試薬

本研究で使用した主な分裂酵母株を以下に記す。HM123 (野生株)、KP2691 (*Arst2*; Rst2 欠損株)、KP2921 (*Δpka1*; PKA 触媒サブユニット欠損株)。分裂酵母の培養には YPD 培地、EMM 培地を用いた。分裂酵母の遺伝学的操作は Moreno ら(1991)の方法に従った。

2. STREP レポータープラスミドの作製

STREP によりルシフェラーゼが発現誘導されるレポータープラスミドを下記の方法で作製した。周らが報告した CRE レポータープラスミド(2012)の CRE 配列を STREP の 3 回繰り返し配列 (5'-GGC TTC CCC TCA TAC ACC CCT CAT ACA CAC CCC TCA TGC AC-3', 下線部が STREP 配列)に置き換えた。

3. STREP レポーターアッセイ

Rst2 の転写活性をモニタリングする為に STREP レポーターアッセイを下記の方法に従いおこなった。STREP レポータープラスミドを分裂酵母株にトランスフォームした。この株を EMM 培地で一晚培養後に回収し、2%グルコースを含む EMM 培地 (高グルコース培地) と 0.1%グルコースを含む EMM 培地 (低グルコース培地) に培地交換をおこなった。ルシフェラーゼの基質である Coelenterazine を添加し、ルミノメーターで発光強度 (Relative Light Unit, RLU) を測定した。

【結果】

1. Rst2 の転写活性のモニタリング

野生株で STREP レポーターアッセイをおこなったところ、低グルコース培地において RLU が上昇した。*Arst2* では低グルコース培地において RLU の変化はみられなかった。この結果より、構築した STREP レポーターアッセイは Rst2 依存的な転写活性をモニタリングしていることが確認できた。また、野生株において、酸化ストレス、浸透圧ストレス、重金属ストレス処理をおこないモニタリングをおこなったが Rst2 の転写活性は上昇しなかった。このため、

Rst2は低グルコース状態特異的に活性化していることが示唆された。

2. PKAはRst2の転写活性を抑制する

これまでに、Rst2はPKAにより高グルコース状態では抑制されていることが報告されている。そこで、PKA触媒サブユニット欠損株である $\Delta pka1$ でモニタリングをおこなった。その結果、 $\Delta pka1$ では低グルコース・高グルコース状態ともに野性株と比較しRst2の転写活性が高くなった。また、 $\Delta pka1$ においても低グルコース培地でRst2の転写活性の上昇がみられた。このことから、PKAはRst2の転写活性を抑制しているが、他の制御因子が低グルコース状態によるRst2の活性化に関与していることが示唆された。

3. 低グルコース状態によるRst2の活性化に酸化還元状態の変化が関与する

フリーラジカルであるROSは酸化ストレスを引き起こすこと、シグナル伝達物質として働くことが知られている。これまでに、分裂酵母において低グルコース状態は酸化ストレスを引き起こすことが報告されている。そこで、ROS発生剤である H_2O_2 を添加した際のRst2の転写活性をモニタリングした。その結果、高グルコース状態では H_2O_2 による活性化はみられなかったが、低グルコース状態では H_2O_2 濃度依存的に活性化された。また、フリーラジカルスカベンジャーであるN-アセチルシステイン(NAC)の濃度依存的に低グルコース状態でみられるRst2の活性化が抑制された。以上の結果から、低グルコース状態によるRst2の活性化に酸化還元状態の変化が関与している可能性が示唆された。

4. ミトコンドリアチオレドキシシンTrx2が欠損するとRst2の転写活性が上昇する

細胞内の酸化還元状態がRst2の転写活性に影響を及ぼしているか調べるため、酸化還元に関与するタンパク質が欠損した株におけるRst2の転写活性を調べた。ミトコンドリアに存在する酸化還元タンパク質であるミトコンドリアチオレドキシシンTrx2欠損株においてRst2の転写活性は野性株と比較し高くなっていた。しかし、細胞質に存在する酸化還元タンパク質であるチオレドキシシンペルオキシターゼTpx1欠損株、酸化還元タンパク質の転写制御に関与する転写因子Pap1欠損株におけるRst2の転写活性は野性株との間に差はみられなかった。以上の結果から、細胞内の酸化還元状態がRst2の転写活性に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

5. 一酸化窒素(NO)がRst2の活性化に関与する

NOはROSと同様にフリーラジカルの一種であり、生体内における様々な現象の制御に関与していることが知られている。そこで、NOがRst2の転写活性に影響するか調べた。その結果、 H_2O_2 と異なりNO発生剤であるSNAPは高グルコース・低グルコース状態ともに濃度依存的にRst2の転写活性を上昇させた。他のNO発生剤であるSNP、DEA-NONOateもSNAPと比較すると活性上昇は低いが、同様にRst2を活性化した。また、NO特異的スカベンジャーであるcalboxy-PTIOの濃度依存的に低グルコース状態によるRst2の活性化が抑制された。さらに、 $\Delta pka1$ においてもNOによるRst2の活性化がみられた。以上の結果から、PKA非依存的にNOはRst2の活性化に関与していることが示唆された。

【考察】

本研究では、低グルコース状態でNOとROSがRst2の転写活性を上昇させることを明らかにした。また、フリーラジカルスカベンジャーであるNAC、並びにNO特異的スカベンジャーであるcalboxy-PTIOが低グルコース状態で起こるRst2の活性化を抑制した。これらのことから、NOとROS共に、またはいずれかが低グルコース状態でのRst2の活性化に関与している可能性が考えら

れる。また、高グルコース状態においてもNOはRst2を活性化するのに対し、ROSは活性化しなかった。そのため、NOとROSによるRst2の活性化メカニズムは異なる可能性も考えられる。

NOによる翻訳後修飾であるS-ニトロソ化は遺伝子発現やシグナル伝達の制御に関与していることが報告されている。また、SNAPによるRst2の活性化がDEA-NONOateより高くなっていた。さらに、SNAPがDEA-NONOateよりS-ニトロソ化を引き起こしやすいことが報告されている。このことから、タンパク質のS-ニトロソ化がRst2の活性化に関与している可能性が考えられる。

これまでに、低グルコース状態になることでROSが産生されること、ミトコンドリアチオレドキシシンがミトコンドリアからのROS産生の制御に関与していることが報告されている。また、酸化還元タンパク質のうちミトコンドリア内で機能しているチオレドキシシンTrx2の欠損株のみがRst2の転写活性が高くなった。このことから、低グルコース状態ではNOとROS共に、またはいずれかが産生され、Rst2を活性化している可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2387号	氏 名	加藤 俊明
論文題目 Title of Dissertation	Possible Involvement of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Glucose Deprivation-Induced Activation of Transcription Factor Rst2 低グルコース状態による転写因子Rst2 の活性化に一酸化窒素・活性酸素種が関与する		
審査委員 Examiner	主 査 中村 俊一 Chief Examiner 副 査 匂坂 敏朝 Vice-examiner 副 査 青井 貴之 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

グルコースはエネルギー源・炭素源として極めて重要な栄養素である。そのため、細胞は細胞内外のグルコース量を感じ、その量に応じて糖新生や解糖系などに関わる遺伝子の発現調節をおこないグルコースを一定量に保とうとする。モデル細胞である分裂酵母において、低グルコース状態で活性化する転写因子としてRst2が知られている。Rst2はSTREP (stress response element of *Schizosaccharomyces pombe*) と呼ばれる転写調節領域に結合することで、糖新生などに関わる遺伝子群の発現調節を行っている。これまでに、Rst2は高グルコース状態ではPKAにより直接リン酸化され、転写活性が抑制されることが知られている。しかし、低グルコース状態によるRst2の活性化メカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、低グルコース状態によるRst2の活性化メカニズムを調べた。

Rst2の転写活性のモニタリング野性株でSTREPレポーターアッセイをおこなったところ、低グルコース培地においてRLUが上昇した。 $\Delta rst2$ では低グルコース培地においてRLUの変化はみられなかった。これまでに、Rst2はPKAにより高グルコース状態では抑制されていることが報告されている。そこで、PKA触媒サブユニット欠損株である $\Delta pka1$ でモニタリングをおこなった。その結果、 $\Delta pka1$ では低グルコース・高グルコース状態ともに野性株と比較しRst2の転写活性が高くなった。また、 $\Delta pka1$ においても低グルコース培地でRst2の転写活性の上昇がみられた。

フリーラジカルであるROSは酸化ストレスを引き起こすこと、シグナル伝達物質として働くことが知られている。これまでに、分裂酵母において低グルコース状態は酸化ストレスを引き起こすことが報告されている。そこで、ROS発生剤であるH₂O₂を添加した際のRst2の転写活性をモニタリングした。その結果、高グルコース状態ではH₂O₂による活性化はみられなかったが、低グルコース状態ではH₂O₂濃度依存的に活性化された。また、フリーラジカルスカベンジャーであるN-アセチルシステイン (NAC) の濃度依存的に低グルコース状態でみられるRst2の活性化が抑制された。

更に、細胞内の酸化還元状態がRst2の転写活性に影響を及ぼしているか調べるため、酸化還元に関与するタンパク質が欠損した株におけるRst2の転写活性を調べた。ミトコンドリアに存在する酸化還元タンパク質であるミトコンドリアチオレドキシシンTrx2欠損株においてRst2の転写活性は野生株と比較し高くなっていた。しかし、細胞質に存在する酸化還元タンパク質であるチオレドキシシンペルオキシターゼTpx1欠損株、酸化還元タンパク質の転写制御に関与する転写因子Pap1欠損株におけるRst2の転写活性は野生株との間に差はみられなかった。

NOはROSと同様にフリーラジカル的一种であり、生体内における様々な現象の制御に関与していることが知られている。そこで、NOがRst2の転写活性に影響するか調べた。その結果、H2O2と異なりNO発生剤であるSNAPは高グルコース・低グルコース状態ともに濃度依存的にRst2の転写活性を上昇させた。

本研究では、低グルコース状態でNOとROSがRst2の転写活性を上昇させることを明らかにした。また、フリーラジカルスカベンジャーであるNAC、並びにNO特異的スカベンジャーであるcalboxy-PTIOが低グルコース状態で起こるRst2の活性化を抑制した。これらのことから、NOとROS共に、またはいずれかが低グルコース状態でのRst2の活性化に関与している可能性が考えられる。また、高グルコース状態においてもNOはRst2を活性化するのに対し、ROSは活性化しなかった。そのため、NOとROSによるRst2の活性化メカニズムは異なる可能性も考えられる。

本研究は、分裂酵母を用いた解析から、低グルコース状態でNOとROS等のフリーラジカルが糖新生などに関わる遺伝子群の発現調節に関与する転写因子Rst2を活性化することを示したものであり、低栄養状態で誘導される遺伝子発現のメカニズムを分子レベルでの解明したものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。