

氏 名 ( 本 籍 )                      おか                      ざき                      しょう                      こ  
岡                      崎                      祥                      子

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬博第376号

学位授与年月日                      平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件                      学位規則第4条第1項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科  
(博士課程) 生命薬学専攻

學位論文題目

# 酸化ストレス応答性転写因子 Yap1 の連鎖的ジスルフィド結合形成を介した活性制御機構

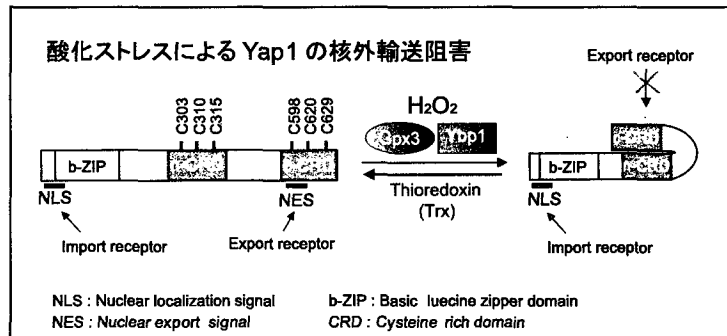
論文審査委員

(主査)	教授	永沼	章
	教授	榎本	武美
	助教授	倉田	祥一朗

## 論文内容要旨

細胞増殖やアポトーシスなどの制御系で中心的な機能を果たす脱リン酸化酵素や転写因子などの活性が、システイン (Cys; C) 残基の酸化還元 (レドックス) 反応により制御されることが報告されている。これらの活性は細胞の運命を決定する一因であり、酸化を受ける分子やそこに含まれる Cys 残基の選択や、酸化された Cys 残基の還元などのシステムが厳密に制御される必要がある。本研究は、細胞内因子のレドックス変化による活性制御の分子機構を理解するため、出芽酵母の酸化ストレス感受性転写因子 Yap1 の Cys 残基の酸化を介した過酸化水素感知機構の解明を目指した。

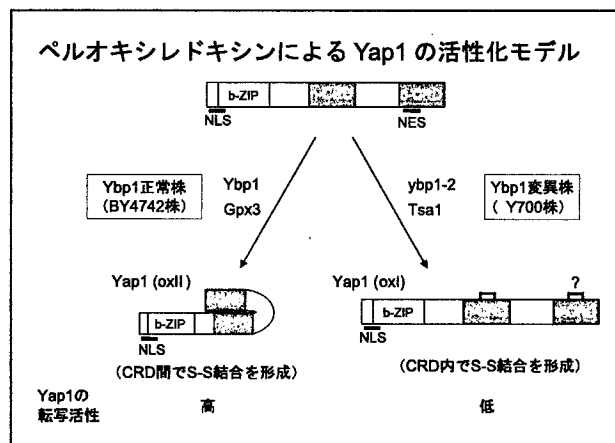
Yap1 は分子内に 2 個の cysteine rich domain (CRD) を持ち、N 末端側は n-CRD (C303, C310, C315)、C 末端側は c-CRD (C598, C620, C629) と呼ばれている。Yap1 は過酸化水素に応答して peroxiredoxin (Prx) 様抗酸化酵素である Gpx3 の助けをかりて n-CRD の C303 と c-CRD の C598 の間にジスルフィド結合を形成する。これに続いて C310, C629 も何らかの形で修飾を受けることにより核外輸送シグナルの隠蔽が起こり、Yap1 は核に局在化ようになる。核に集積した Yap1 は 70 種以上の標的遺伝子にコードされた抗酸化酵素群の発現を誘導する。また、Yap1 分子内のジスルフィド結合はチオレドキシンによって還元されることも明らかとなっている。



### ペルオキシレドキシンを介した過酸化水素の認識と伝達

Prx は原核生物から高等真核生物にまで広く保存されたペルオキシダーゼで、チオレドキシンを介して供給される NADPH を電子供与体としている。前述のように Yap1 は Prx と同様のペルオキシダーゼ活性を持つ Gpx3 の助けをかりて酸化 (活性化) されることが報告されており、酵母 BY4742 株では Gpx3 を欠損させると過酸化水素による Yap1 の活性化が認められなくなる。しかし、Y700 株では、Gpx3 欠損の影響は認められず、Prx の一種である Tsa1 の欠損により Yap1 の活性化が起こらなくなる。Gpx3 と Yap1 との相互作用には第 3 の因子として Yap1 結合蛋白質である Ybp1 が関与している。そこで Y700 株の *YBP1* 遺伝子の塩基配列を検討したところ、本遺伝子にナンセンス変異のあることが判明し、この *YBP1* 遺伝子の変異 (*ybp1-2*) により Y700 株では Gpx3 が Yap1 の活性化に寄与しなくなり、代わりに Tsa1 が Yap1 の活性化に関与していることが明らかとなった。Tsa1 と Gpx3 に依存した Yap1 の酸化機構を比較するため、チオレドキシン等の還元系酵素群と Gpx3 又は Tsa1 を含む、Yap1 の試験管内酸化還元実験系を構築し、Yap1 の酸化反応を検討した結果、この系において Tsa1 は Gpx3 と同様に Ybp1 非存在下で、Yap1 中の CRD 間でジスルフィド結合を形成した Yap1 酸化体 (Yap1 (oxII)) の形成を促進することが判明した。また興味深い事に、Yap1 の酸化体形成において、これまでに知られている Yap1 (oxII)

形成の前に、別の酸化体 (Yap1 (oxI)) が形成されていることが判明した。Yap1 (oxI) はドメイン内でジスルフィド結合を形成していると考えられ、Yap1 (oxI) 形成も Tsa1 または Gpx3 によって同様に促進されることが判明した。これらの結果から、Tsa1 は Gpx3 と同様の機構によって Yap1 の酸化を補助していると考えられる。しかし、Yap1 の酸化が Tsa1 に依存している Y700 株の細胞内には Yap1 (oxI) が検出されるだけで、Yap1 (oxII) の形成は認められなかった。細胞内では Tsa1 が Yap1 に対してかなり過剰に発現している (200 倍) ため、1 分子の Yap1 に多数の Tsa1 が作用しようとして、かえって CRD 間のジスルフィド結合形成が阻害されてしまうという可能性が考えられる。また、Yap1 の酸化が Tsa1 に依存している Y700 株では Gpx3 に依存している BY4742 株に比べて Yap1 の転写活性が低いことから、Yap1 が最大限の活性を示すためには Yap1 (oxII) にまで酸化される必要があると思われる。



Ybp1 の変異により Gpx3 が Yap1 に対して作用できなくなった場合には、細胞内に高濃度に存在する Prx である Tsa1 が Gpx3 の代わりに Yap1 に対して作用するという事実は、Prx が元々過酸化水素の発生を認識するレドックスセンサーとしての機能を持っていることを示唆している。Ybp1 の変異していない酵母 BY4742 株においても、Tsa1 は Yap1 以外の蛋白質を標的として、その蛋白質に酸化シグナルを伝達しているのかもしれない。また、酵母の Tsa1 は哺乳類の Prx と 60% 以上の高い相同性を示すことから、レドックスセンサーとしての機能が哺乳類細胞においても保存されている可能性が高い。

#### ジスルフィド結合架け替え反応を介した Yap1 の酸化機構

Yap1 の酸化反応は Yap1 (oxI) の形成を経て Yap1 (oxII) へと進行することから、Yap1 の酸化機構はこれまで考えられていたものより複雑であることが示唆された。そこで、より詳細に Yap1 の酸化反応を解析したところ、Yap1 は Yap1 (oxI) を経て Yap1 (oxII) となった後、最終的にさらに別の酸化体を形成することが判明した。Yap1 (oxI) は n-CRD 内の C310 と C315 のジスルフィド結合により形成されることが、ペプチダーゼで分解した Yap1 断片のマススペクトル解析により示された。また、Yap1 (oxII) はこれまでに報告のある C303-C598 と C310-C629 の 2 つのジスルフィド結合を形成した酸化体 (以降 Yap1 (oxII-1) と呼ぶ) であり、最後に形成される酸化体は全ての Cys 残基が酸化された酸化体 (以降 Yap1 (oxII-2) と呼ぶ) であることが示唆された。Yap1 (oxI) と Yap1 (oxII-1, 2) では、C310 がジスルフィド結合を形成している相手が異なることから、Yap1 (oxI) から Yap1 (oxII-1) を形成する際には、ジスルフィド結合の架け替えが起こっていると思われる。

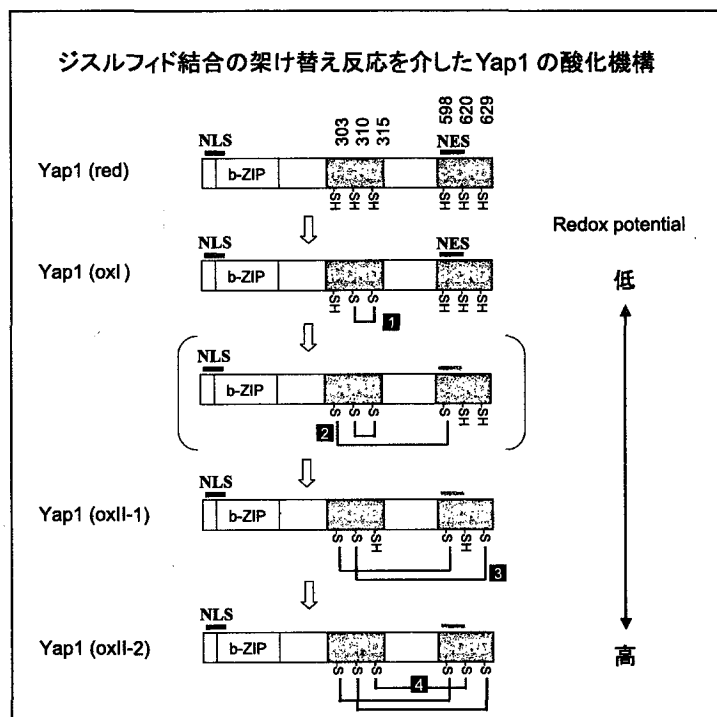
本研究により、Yap1 が複雑な反応を経て酸化されることが明らかとなったが、この Yap1 の酸化シス

テムにおいては、細胞内が過酸化状態になったことを Gpx3 自身が素早く酸化されることにより感知し、その情報が Yap1 に伝わることによって Yap1 の酸化が始まる。一方、酸化された Yap1 および Gpx3 は、チオレドキシンの還元状態、すなわち NADPH の濃度に依存して還元されると考えられるが、両者を比較したところ Gpx3 は Yap1 よりも NADPH によって還元されやすいことが判明し、Yap1 を酸化したのちに素早く還元されて元の状態に戻ることが示唆された。しかし、Yap1 は Gpx3 から情報を受け取った後、細胞質から核内へ移行し、細胞内が元の還元状態に戻るまで（NADPH 濃度が十

分高くなるまで）その活性（酸化状態）を維持しなければならない。各酸化型 Yap1 を比較したところ、Yap1 (oxI) は Yap1 (oxII) よりも還元されやすい（レドックスポテンシャルが低い）ことが示唆されたことから、Yap1 は分子内のジスルフィド結合の掛け替え反応による構造変化を起こして Yap1 (oxII) となることでレドックスポテンシャルを上げ、迅速な還元を防いでいると考えられる。

一方、これまで機能未知であった Yap1 の C315 と C620 を変異させた Yap1<sup>CCT.CAC</sup> の酸化を試験管内酸化還元系により検討したところ本変異 Yap1 は oxI 型酸化体から oxII-1 型酸化体に移行しにくいことが判明し、また、細胞内における Yap1<sup>CCT.CAC</sup> の酸化反応では、野生型 Yap1 では認められない複合体形成が認められることも明らかとなった。また、Yap1 (oxII-2) を形成できない Yap1<sup>CCT.CAC</sup> の酸化型は野生型の Yap1 よりも早く還元されたことから、Yap1 は Yap1 (oxII-2) を形成しジスルフィド結合の本数が増えることでより安定に活性を示すものと考えられる。これらの結果は、C315 と C620 も Yap1 の活性化機構において重要な役割を果たしていることを示唆している。本研究で明らかとなった 6 個の Cys 残基を用いたジスルフィド結合の掛け替え反応は、活性チオール基をもつ多様な蛋白質が存在する細胞内において、Yap1 分子内に外部から影響を受けにくい微小空間を構築するために必要であると考えられる。

本研究において、Gpx3 のみならず細胞内の主要な抗酸化酵素である Tsa1 などの Prx が過酸化水素感知に機能することが明らかとなった。細胞内において最初に過酸化水素還元働く Prx が過酸化水素の認識にも機能することは非常に合理的である。Yap1 は Gpx3 の Prx 活性を利用して迅速な過酸化水素の認識を行っており、その後 6 個の Cys 残基を使ったジスルフィド結合の掛け替え反応により、他の蛋白質と結合することなく、安定で可逆的な酸化体形成を実現していることも明らかとなった。今回示



された Yap1 の過酸化水素感知の分子機構は、多様な蛋白質が存在する細胞内で、活性チオールをもつ蛋白質がどのようにして迅速にレドックス変化を感知し、チオール基の酸化還元による可逆的な活性の ON/OFF を達成しているのか、その機構の全容解明に重要な知見を与えるものである。

## 審査結果の要旨

近年、細胞増殖やアポトーシスの調節に関与する脱リン酸化酵素や転写因子などの活性がシステイン (Cys; C) 残基の酸化還元反応により制御されていることが明らかとなってきた。これら因子の活性は細胞の運命を決定する重要な要因であるが、その調節機構には不明な点が多い。本研究は細胞内因子の酸化還元による活性制御の分子機構を理解するため、出芽酵母の酸化ストレス感受性転写因子である Yap1 の Cys 残基の酸化を介した過酸化水素感知機構の解明を試みたものである。

Yap1 は分子内に 2 個の cysteine rich domain (CRD) を持ち、N 末端側は n-CRD (C303, C310, C315), C 末端側は c-CRD (C598, C620, C629) と呼ばれている。酵母に酸化ストレス (過酸化水素処理) が負荷されると、peroxiredoxin (Prx) 様抗酸化酵素である Gpx3 がこれを感知し、まず Yap1 の n-CRD の C303 と c-CRD の C598 の間に disulfide 結合を形成する。これに続いて C310, C629 も何らかの形で酸化修飾を受けることにより、Yap1 の核外輸送シグナルが隠蔽され、Yap1 は核に局在化ようになる。核に集積した Yap1 は 70 種以上の標的遺伝子にコードされた抗酸化酵素群の発現を誘導する。本研究では、最少必要因子で構成される試験管内反応系を用いて、過酸化水素による Yap1 の酸化反応を検討し、これまでに知られている Yap1 の酸化体 (oxII) 形成の前に、別の酸化体 (Yap1 (oxI)) が形成されることを見出し、この新しい酸化体が細胞内でも形成されていることを明らかにした。Yap1 (oxI) が分子内での disulfide 結合の複雑な掛け替え反応によって、より還元され難い Yap1 (oxII) となることも判明した。また、この試験管内反応が Gpx3 のみならず主要な Prx である Tsa1 によっても同様に生起することを見出し、Prx ファミリーが酸化ストレスを認識するレドックスセンサーとしての機能を持っていることを初めて示した。また、Yap1 が有する Cys 残基のうち C315 と C620 は機能未知で必要ないとされてきたが、これらも Yap1 の一段階目の酸化反応およびそれに続く disulfide 結合の架け替え反応に必要であることが試験管内酸化実験から明らかとなった。以上の結果から、Yap1 は Prx の介在により過酸化水素特異的な迅速な応答性を維持しており、さらに 6 個の Cys 残基を巧みに利用することによって他の蛋白質と相互作用をすることなくドメイン間の微小空間内で輸送シグナルの ON/OFF を達成していることが示唆された。

本論文は酸化ストレスの感知とその伝達の機構に関して新しい知見を付加するものであり、その学術的価値は極めて高い。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。