



大阪公立大学大学院農学研究科 三 浦 夏 子

低酸素条件下における代謝酵素群による集合体形成の発見およびその制御機構の解析

はじめに

出芽酵母やがん細胞等では、低酸素条件下で解糖系の代謝が亢進する。この代謝調節メカニズムは、低酸素に応答した転写調節に起因することが知られてきたが、低酸素条件下における各酵素の挙動や触媒機能の変化等については不明な点が多い。

筆者らは2013年に、出芽酵母を低酸素条件にさらすと細胞質内で解糖系酵素を含むタンパク質群が集合体を形成することを初めて報告し、集合体形成によって解糖系代謝が促進される可能性を示した¹⁾。この現象は2016年以降、他グループによってセンチュウの神経細胞²⁾やがん細胞株^{3,4)}等で相次いで再確認され、集合体は“Glycolytic body (G-body)”等と名付けられた。

細胞内の代謝酵素が、特定の条件下で液-液相分離により集合体を形成する現象は近年注目を集めており、G-body以外の大規模な酵素集合体としてはHeLa細胞内で*de novo* purine合成経路にかかわる酵素群が形成するPurinosomeが報告されている。筆者はG-bodyやPurinosomeを含む一過的に形成される酵素集合体群をまとめてMetabolic Enzymes Transiently Assembling (META) bodyと名付け⁴⁾、その形成制御機構について解析を進めている。

1. 低酸素条件下における代謝酵素群による集合体形成の発見

解糖系酵素群はそのすべてが解糖系代謝以外の機能(moonlighting機能)をもつことが知られているが、moonlighting機能には細胞外における機能も含まれる。例えば解糖系酵素の中でも細胞内での存在量が最も多い酵素の一つであるエノラーゼは、細胞外で細胞表面に結合することでプラスミノゲン受容体等として機能する。一方で、解糖系酵素が細胞外に分泌されるメカニズムは2010年代当時全く不明であった。筆者らは解糖系酵素の分泌経路を調べる目的で、各種解糖系酵素に蛍光タンパク質をタグ付けして出芽酵母内で発現し、いくつかの解糖系酵素が確かに細胞外に分泌されていることを示した⁵⁾。筆者らはまたその過程で偶然、静置培養した細胞質内で解糖系酵素群が集合体を形成することを見出した。さらに培養方法を工夫することで、培養液中の酸素濃度が低下した低酸素条件下でこの集合体が形成されることが明らかになった(図1)。筆者らは解糖系酵素群の中でも特に細胞内での存在量が多いエノラーゼについて、集合体を形成しない1アミノ酸変異を見出し、これを導入した集合体形成不全株を構築して細胞内での酵素集合体形成が細胞の代謝に与える影響を検証した。大阪大学の福崎研究室で開発された、代謝ターンオーバー解析を用いてグルコースからピルビン酸・オキサロ酢酸への代謝変換をそれぞれ経時的に追跡したところ、集合体を形成する株では集合体形成不全株に比べて、低酸素条件下でより迅速に代謝変換が進んでいた。これは細胞が低酸素条件下で代謝酵素群の集合体を形成し、酵素間

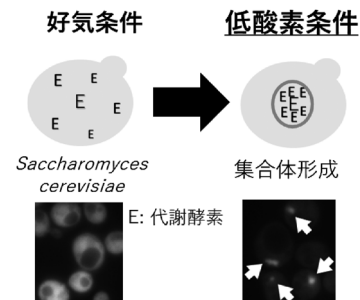


図1. 低酸素条件下における集合体形成

の距離を縮めることで多段階からなる生合成反応を効率化していることを示唆するものであり、従来の転写制御に加えた解糖系代謝調節の新たな仕組みとして注目を集めている。

2. 低酸素条件下でタンパク質の局在解析を行うための手法開発

低酸素条件下での解糖系酵素群による集合体形成は、出芽酵母以外にも様々な細胞で存在が確認されてきたが、その制御機構には不明な点が多い。研究の進展が妨げられている原因の一つとして、低酸素培養に用いる手法があげられる。従来の手法では100 mLないし2 mLのバイアルに培養液を入れ、培養前に二酸化炭素を吹き込むことで強制的に培地を低酸素状態にしていた。この手法で集合体の形成と観察を行う際は、一度に多数のサンプルを扱うことが困難であり、また操作に習熟が必要であるため、再現性のあるデータをとるためには長い時間を要した。そこでまず、集合体形成の観察を迅速に多サンプルで行える、簡易な低酸素培養系の検討を行った。

様々な手法を検討したところ、解糖系酵素群の集合体は固形培地・液体培地どちらで培養した場合も形成されること、培養系を小スケール化することで集合体形成がみられる時期が早くなることが明らかとなった。また、96ウェルプレートと低酸素インキュベーターを組み合わせることで、培地量を従来の約500分の1以下に抑えた150 μ Lスケールで安定的に低酸素状態を維持できる培養系を構築することに成功した⁶⁾。

構築した小スケール低酸素培養法は、集合体形成酵素の動態を追跡するほか、集合体形成に影響する物質のスクリーニングにも使用可能である。そこで、G-bodyを形成する3つの酵素(エノラーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ)について経時的な動態を追跡したところ、各酵素の集合順序は厳密に規定されており、3つの酵素の中でもエノラーゼが最も早く集合することが明らかになった(図2)⁶⁾。さらに、AMPK阻害剤であるDorsomorphinが濃度依存的にG-body形成を遅延させることを見出した⁶⁾。

G-bodyは出芽酵母だけでなく、肝がん細胞株を含む複数のがん細胞株でも確認できることから、病態への関連についても

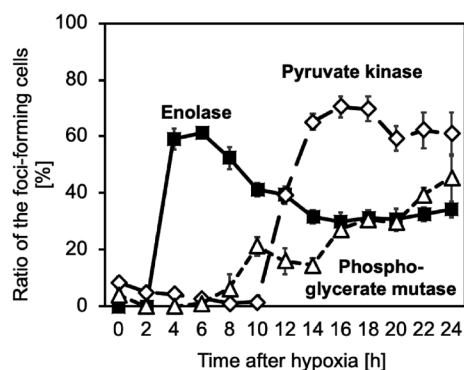


図2. 解糖系酵素による集合体形成の経時変化

注目が集まっている。G-body の形成制御による細胞代謝の調節効果を捉えるには、リアルタイムでの代謝測定が有効である。そこで、細胞から個体に至る様々な系で、超偏極 ^{13}C -NMR等を用いて低酸素条件下で簡便にかつ非侵襲的に糖代謝のターンオーバーを測定可能な系の構築を進めてきた。具体的には、がん細胞の三次元カプセル化法を工夫し、特定の直径においてがん細胞株を簡便に低酸素培養できること、三次元培養した細胞を用いて低酸素条件下における放射線治療効果を超偏極 ^{13}C -NMRで検証できることを示した⁷⁾。さらに、低酸素条件下で特異的にみられる代謝変換反応である、2-ヒドロキシグルタル酸の生成を非侵襲的に捉えることのできる、超偏極 ^{13}C -NMR用の新たなプローブを開発した^{8,9)}。ここで構築したがん細胞株の三次元培養系は、出芽酵母等を用いた微生物の培養系にも適用可能である。

以上により、*in vivo*, *in vitro*それぞれの条件下において、低酸素条件下における代謝酵素集合体の形成に伴った代謝変化を追跡できる系を構築できた。

3. 集合体形成制御機構の解析

低酸素条件下における解糖系酵素群による集合体形成機構は、現在もほとんど明らかになっていない。いくつかの障害剤や遺伝子ノックアウト等により、集合体の形成が遅延あるいは抑制されることは見出されている^{1,3)}が、細胞の生育に影響を与えることなく、集合体の形成のみを完全に阻害することは現状では不可能である。筆者は集合体を形成する酵素群のアミノ酸配列が集合体形成の制御メカニズムの鍵を握ると考えて、すべての集合体形成酵素がもつアミノ酸配列について解析を進めている。特にエノラーゼでは、初期の研究により、N-末端の5-25番目に位置するアミノ酸が集合体形成に深くかかわること、22番目のバリン残基をアラニンに置換すると集合体形成が阻害されることを示した¹⁾。エノラーゼがもつ集合体形成領域は分子表面に位置しており、液-液相分離するタンパク質でみられるIntrinsically disordered regionと異なって明確な構造をとることが結晶構造解析により示されている。したがって、エノラーゼの集合体形成機構には既知の液-液相分離タンパク質とは異なる原理が働いていることが予想される。今後、前述した小スケール低酸素培養法などを活用することで、集合体の形成制御にかかわる分子や修飾機構等が明らかになると期待できる。

おわりに

低酸素条件下における酵素群の集合体形成について筆者らが2013年に初めて報告してから今年で10年になる。この間、様々なグループにより出芽酵母をはじめとする広範な真核細胞で同様の現象が観察・追試され、筆者らのグループでも低酸素培養法の開発を進めたことで、ようやくこの現象が存在することを世界中の誰もが簡単に確認できる状況を整えることができた。集合体形成の制御機構やその機能にはまだ不明な点が多く残されているが、今後は本稿で紹介した手法などを用いることで、酵素集合体が関与する生命現象の解明や、酵素集合体の形成原理を用いたものづくりへと展開を進めていきたい。

(引用文献)

- 1) Miura N, Shinohara M, Tatsukami Y, Sato Y, Morisaka H, Kuroda K, Ueda M. Spatial reorganization of *Saccharomyces cerevisiae* enolase to alter carbon metabolism under hypoxia. *Eukaryotic Cell*, 12, 1106–1119 (2013).
- 2) Jang S, Nelson JC, Bend EG, Rodríguez-Laureano L, Tueros FG, Cartagenova L, Underwood K, Jorgensen EM, Colón-Ramos DA. *Neuron*, 90, 278–291 (2016).
- 3) Jin M, Fuller GG, Han T, Yao Y, Alessi AF, Freeberg MA, Roach NP, Moresco JJ, Karnovsky A, Baba M, Yates JR, Gitler AD, Inoki K, Klionsky DJ, Kim JK. *Cell Rep.*, 20, 895–908 (2017).
- 4) Miura N. Condensate formation by metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, 10(2), 232 (2022).
- 5) Miura N, Kirino A, Endo S, Morisaka H, Kuroda K, Takagi M, Ueda M. Tracing putative trafficking of the glycolytic enzyme enolase via SNARE-driven unconventional secretion. *Eukaryotic Cell*, 11, 1075–1082 (2012).
- 6) Yoshimura Y, Hirayama R, Miura N*, Utsumi R, Kuroda K, Ueda M, Kataoka M. Small-scale hypoxic cultures for monitoring the spatial reorganization of glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology International*, 45, 1776–1783 (2021).
- 7) Read GH, Miura N, Carter JL, Kines KT, Yamamoto K, Deva-sahayam N, Cheng JY, Camphausen KA, Krishna MC, Kesarwala AH. Three-dimensional alginate hydrogels for radiobiological and metabolic studies of cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 197–204 (2018).
- 8) Miura N, Mushti C, Sail D, Bingham J, Yamamoto K, Brender JR, Seki T, Matsumoto S, Camphausen KA, Krishna MC, Swenson RE, Kesarwala AH. Synthesis of [1- ^{13}C]- α -ketoglutarate enables non-invasive detection of 2-hydroxyglutamate. *NMR in Biomedicine*, e4588 (2021).
- 9) AbuSalim JE, Yamamoto K, Miura N, Blackman B, Brender JR, Mushti C, Seki T, Camphausen KA, Swenson RE, Krishna MC, Kesarwala AH. Simple esterification of [1- ^{13}C]- α -ketoglutarate enhances membrane permeability and allows for noninvasive tracing of glutamate and glutamine production. *ACS Chemical Biology*, 16, 2144–2150 (2021).

謝 辞 低酸素条件下における解糖系酵素の集合体形成は、京都大学大学院農学研究科の植田充美先生の研究室で博士後期課程在籍中に見出し、その後の解析は大阪府立大学大学院生命環境科学研究科（現大阪公立大学大学院農学研究科）の片岡道彦先生の研究室で行っています。常に温かくご指導をいただきました。植田先生と片岡先生に心から御礼申し上げます。また、両研究室のスタッフ・学生の皆様、研究の展開にご助力いただいたすべての皆様に、厚く御礼申し上げます。