

| | |
|--------------|--|
| Title | Functional analysis of Nucleoredoxin |
| Author(s) | 林, 達也 |
| Citation | 大阪大学, 2013, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/60095 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【48】

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 林 達也 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (理学) |
| 学位記番号 | 第 25829 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 25 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻 |
| 学位論文名 | Functional analysis of Nucleoredoxin (ヌクレオレドキシンの機能解析) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 岡田 雅人 (副査) 教授 関口 清俊 教授 吉川 和明 教授 三木 裕明 |

論文内容の要旨

It has been widely accepted that oxidative stress imposed by reactive oxygen species (ROS) damages biomolecules such as nucleic acids, proteins, and lipids. Indeed, augmented levels of oxidative stress are related to various human diseases, such as cancer, diabetes, and neurodegenerative disease. Therefore, ROS have been generally regarded as harmful molecules to the human health. On the other hand, recent studies have revealed the importance of ROS as a physiological second messenger. For example, the importance of ROS in intracellular signaling elicited by tumor necrosis factor (TNF)-alpha has been documented in detail. In TNF-alpha signaling, production of ROS is linked to activation of apoptosis signaling-regulating kinase-1 (ASK-1). ASK-1 forms a protein complex with thioredoxin (TRX), which protects ASK-1 from unintended activation. When cells are stimulated with TNF-alpha, ROS are rapidly generated and oxidizes TRX. Oxidized TRX dissociates from ASK-1, resulting in ASK-1 activation and the downstream cell death signaling.

TRX is evolutionarily conserved from prokaryotes and possesses a pair of Cys residues, which are very sensitive to oxidation and form an intramolecular disulfide bond. By utilizing these Cys residues, TRX physiologically functions as an

electron donor for reducing disulfide bonds in many proteins. Thus, TRX makes a global contribution to maintain the redox homeostasis in cells by restoring a number of oxidatively damaged proteins. However, in TNF-alpha signaling, oxidation of TRX ultimately leads to ASK-1 activation. In this case, TRX plays a very specific function to regulate the activity of one signaling pathway.

Nucleoredoxin (NRX), a TRX family protein containing a pair of redox-active Cys residues, has been reported to regulate the Wnt signaling pathway. NRX directly binds to Dishevelled (Dvl), an adaptor molecule essential for Wnt signaling, and inhibits its function. When NRX is oxidized, it dissociates from Dvl and then Dvl becomes to activate downstream signaling. Therefore, NRX also functions as a redox sensor to regulate the activity of Wnt signaling, which is very similar to the case of the redox-dependent regulation of ASK-1 by TRX. However, it remained unknown whether NRX has some other target molecule(s) than Dvl, which led me to analyze the novel function of NRX by searching for NRX-binding proteins.

I first investigated NRX-interacting proteins in cells. For this purpose, I generated culture cell lines stably expressing FLAG-tagged NRX and then performed immunoprecipitation with anti-FLAG antibody for proteins that co-precipitate with FLAG-NRX. Mass spectrometric analyses revealed that one of the major co-precipitated proteins was Flightless-I (Fli-I). I also confirmed the interaction between endogenous NRX and Fli-I proteins. Fli-I was first identified in studies on *Drosophila flightless-I* mutants, which could not fly because of flight muscle defects. It was reported that Fli-I binds to myeloid differentiation primary response gene (88) (MyD88) and suppresses its function to mediate lipopolysaccharide (LPS)-induced activation of NF-kappaB through the Toll-like receptor (TLR) 4/MyD88 pathway. I then investigated the possible effect of NRX overexpression on LPS signaling and found that it can potentiate the negative effect of Fli-I. To explore the molecular mechanism of this phenomenon, I expressed and purified the recombinant proteins for NRX, Fli-I, and MyD88, and then performed *in vitro* binding assays. As a result, I found that the interaction between Fli-I and MyD88 required the presence of NRX, thus implicating the adaptor function of NRX in linking Fli-I to MyD88. To further confirm the role of NRX in LPS signaling, I used embryonic fibroblasts (MEF) obtained from *NRX*-deficient mice, which had been generated in the laboratory I belonged to. I investigated the NF-kappaB signaling activity of MEFs stimulated with LPS and found that the activity was significantly augmented in *NRX*-deficient MEFs, thus clearly indicating the suppressive effect of NRX on LPS signaling.

As an alternative approach for searching novel NRX-interacting proteins, I also performed pull-down analyses using GST-fusion proteins of NRX as bait and found Phosphofructokinase-1 (PFK-1). I also confirmed the interaction between endogenous NRX and PFK-1 proteins. Next, I measured the activity of PFK-1 with MEFs and found that it was significantly decreased in *NRX*-deficient MEFs. To further examine the effect of NRX on the activity of PFK-1, I measured the activity of PFK-1 using recombinant PFK-1 and NRX proteins. The activity of PFK-1 was significantly increased in the presence of NRX. PFK-1 is known as the rate-limiting enzyme of glycolysis, and thus, I examined adenosine triphosphate (ATP) level in MEFs and found that the ATP level was decreased in *NRX*-deficient MEFs in comparison to WT MEFs. Recent studies have shown that suppression of glycolysis can redirect metabolic flux towards the oxidative pentose phosphate pathway (PPP). Indeed, I confirmed that the levels of two major products of PPP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen (NADPH) and glutathione (GSH), were increased in *NRX*-deficient MEFs. Increasing GSH level may contribute to the acquisition of resistance to ROS. To confirm this effect, I examined the viability of the cells treated with hydrogen peroxide. Most of WT MEFs died within 6 hours after hydrogen peroxide exposure, whereas most of *NRX*-deficient MEFs were alive. These results indicate that NRX affects cellular metabolism by upregulating the activity of PFK-1.

Publication:

Hayashi T, Funato Y, Terabayashi T, Morinaka A, Sakamoto R, Ichise H, Fukuda H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88). *J. Biol. Chem.* 285, 18586-18593 (2010)

論文審査の結果の要旨

林達也さんは酸化還元（レドックス）応答因子 nucleoredoxin (NRX) の機能解析に取り組んだ。NRX は分子内でジスルフィド結合を作ることで可逆的に酸化、還元される分子特性をもつことが知られていたが、細胞内でどのような役割を担っているのか不明の部分が多く、その点を明らかにするために研究を開始した。細胞内で機能する蛋白質の多くは他の蛋白質と相互作用することで機能を発揮していることから、林さんは NRX の新規結合蛋白質の探索を行った。まず、NRX を安定的に発現する培養細胞株を作製し、そこから免疫沈降法によって NRX を含む蛋白質複合体を集めたところ、複数の蛋白質が含まれていることを見つけ、その中でも主要な蛋白質の一つとして Flightless-I (Fli-I) を質量分析で同定した。Fli-I は細菌の外膜成分であるリポ多糖 (LPS) による刺激応答など、自然免疫応答シグナル伝達に重要な分子 MyD88 に結合してその機能を抑制することが知られていた。林さんは NRX が Fli-I や MyD88 を介して自然免疫応答シグナル伝達に影響しているのではないかと考え、その詳細を調べた。その結果、Fli-I と MyD88 は直接には十分に結合できず、NRX がアダプターとして両蛋白質を結びつけていることを発見した。また、この作用によって、NRX は LPS 刺激によって起こる転写因子 NF-kappaB の活性化を抑制する働きを持つことを見つけた。実際、所属する研究室で作製されていた *NRX* 遺伝子欠損マウスから胚性繊維芽細胞 (MEF) を樹立して LPS 刺激応答を調べたところ、野性型マウスから樹立した MEF と比較して明らかに応答が強くなっているということも確認した。これらの実験結果により、NRX が蛋白質間相互作用を介して自然免疫応答に関わるという意外な機能を明らかにすることができた。また、結合蛋白質を探索する別のアプローチとして、GST 融合型 NRX を用いたアフィニティークロマトグラフィーも行った。その結果、ブタ組織抽出物からも結合蛋白質を見つけ、その中に phosphofructokinase-1 (PFK-1) を同定した。PFK-1 は解糖系の律速段階を担う酵素として古くから知られ、代謝産物や酵素自身の糖付加などの翻訳後修飾によって機能制御を受けていることも知られていた。林さんは、NRX が PFK-1 の機能制御に関わっているのではないかと考え、上記の *NRX* 欠損 MEF で内在性 PFK-1 の酵素活性を測定した。すると、野性型 MEF と比較して酵素活性が減弱していることが分かった。この効果が直接的であるか調べるため、組換え蛋白質として NRX と PFK-1 を発現、精製して酵素活性測定を行った。その結果、PFK-1 の酵素活性は NRX 蛋白質を添加することで促進されることが明らかになり、NRX が PFK-1 の働きを強める効果をもつことが分かった。PFK-1 は解糖系の律速酵素であるので、その活性異常は ATP レベルに影響することが予想されたが、実際 *NRX* 欠損 MEF では ATP レベルが有意に落ちていることも確認できた。PFK-1 の活性低下は解糖系に影響するだけでなく、ペントースリン酸経路を促進することが知られており、その結果として細胞のレドックス状態の維持に重要な NADPH や還元型グルタチオンを増加させることが予想された。林さんはこれらの測定も行い、*NRX* 欠損 MEF において NADPH と還元型グルタチオンが増加すること、また細胞が酸化ストレスに対して抵抗性を増していることも明らかにした。これらの実験結果は NRX が PFK-1 の活性を制御する重要な因子であり、細胞の基本的なエネルギー代謝、レドックス制御に重要な役割を果たしていることを示している。林さんは、これら NRX の新規結合蛋白質 Fli-I、PFK-1 の同定および機能解析を通じて NRX の新たな分子機能を明らかにし、エネルギー代謝など細胞の基本機能の制御に関わる生物学上の重要な発見に至った。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。