

多機能性を持つ Moonlighting Proteins

原田 直樹¹，三谷 壘一²，山地 亮一¹

「一遺伝子一酵素説（一ポリペプチド説）」と呼ばれる仮説に従うだけではすべての生命現象を解き明かすことはできない。またヒトゲノムの全塩基配列の解析から、遺伝子の総数が予想されていたよりもかなり少ないことが判明し、生命現象が想像以上に複雑であることが再認識された。予想と現実における遺伝子数のギャップを埋めるためには、単一遺伝子が異なる複数のタンパク質をコードする「選択的スプライシング」について理解するだけでなく、単一タンパク質が多機能を担う「Moonlighting Proteins」についても理解する必要がある。本稿では、解糖系酵素として知られるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）を例にあげ、「Moonlighting Proteins」について概説する。GAPDHは高等動物に限らず、細菌、酵母、植物にも存在することから、ある種の生物でのGAPDHの「Moonlighting（副業）」は他の生物でも発揮される可能性を持つ。

1. はじめに

遺伝子の役割を解き明かす初期の研究では、遺伝学者は一般的に既知の遺伝的特徴を生理学的、そして生化学的に決定しようとしていた。たとえばショウジョウバエでは、多数の遺伝子の変異により眼の色や翅の形といった形態的に観察しやすい多くの異なる表現型が見つかったので、それらの表現型を制御する遺伝子を同定することや、それらの遺伝子の染色体上での位置を決定することが研究課題であった。これらの実験は、表現型としてだけ偶然出現した変異を生化学的に解析するという手法であったが、1941年にBeadleとTatumはこれまでとは異なる手法で研究を進めた成果を報告した¹⁾。これが有名なアカパンカビを用いた実験であり、既知の生化学的現象に突然変異を誘発する

ことで、その生化学的現象がどのような遺伝子に制御されているのかを解析するという手法である。アカパンカビは最少培地（主な栄養源として、塩、グルコース、ピオチンを含む）と富栄養培地（アミノ酸、ビタミン、プリン、ビリミジンも含む）で生育可能であるが、アカパンカビにX線等を照射することで人工的に変異を誘発し、富栄養培地では正常に生育するが最少培地では育たないアカパンカビの変異体を単離した。これらの変異体は、特定のビタミン等を合成する代謝経路を失っているため、栄養要求性を明らかにすることで代謝経路と遺伝子との関わりをより明確にすることができた。これらの実験結果から、彼らは「遺伝子は特定の一つの酵素の生成に関与し、その特異な作用を介して生物の表現型を支配している」という考えを提唱した。これが「一遺伝子一酵素説」と呼ばれる仮説であるが、研究が進展するにつれて、実際には多くの酵素が複数のポリペプチド鎖から構成されているため、現在では一つの遺伝子が特定の一つのポリペプチド鎖に対応するという「一遺伝子一ポリペプチド説」として理解されている。しかし、今日ではこの仮説に従うだけではすべての生命現象を理解することはできない。本来ならこの仮説に従えば、生命活動を維持するためにはヒトの遺伝子の数は細胞中のタンパク質の数に近いはずであり、ヒトゲノム計画が開始された当初は、80,000～100,000個の遺伝子が存在すると予想されていた²⁾。しかしヒトゲノムの全塩基配列の解析が完了すると、遺伝子の総数は予想されていたよりもかなり少なく、22,287個（ただしアブストラクトに

¹大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻（〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1）

²神戸大学農学研究科生命機能科学専攻（〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1）

Moonlighting proteins

Naoki Harada¹, Takakazu Mitani² and Ryoichi Yamaji¹ (¹Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan, ²Department of Agrobioscience, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, 1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870279

© 2015 公益社団法人日本生化学会

は20,000~25,000と記載されている)であり³⁾, 生命現象が想像以上に複雑であることが示唆された。この数字上のギャップを埋める説明として, (1)単一遺伝子が異なる複数のタンパク質をコードする, (2)単一タンパク質が多機能を担う, という二つの仕組みがあげられる。(1)は, 選択的スプライシングと呼ばれ, 教科書レベルでよく知られた機構である。簡単に説明すると, 遺伝子発現の過程においてDNAからmRNA前駆体が合成される。つまりmRNA前駆体はDNAのコピーであり, エキソンとイントロンを含む。続いてスプライシングと呼ばれる反応でmRNA前駆体からイントロンが切り取られ, 残りの隣り合ったエキソンどうしが結合してmRNAとなる。しかしスプライシングは隣り合うエキソンどうしが結合するという単純な機構からだけで成り立っておらず, 実際は多くのmRNA前駆体において異なる組み合わせのエキソンが結合する選択的スプライシングが起こり, その結果として異なるmRNAが作られる。一方(2)は, Moonlighting Proteinsと呼ばれるタンパク質が関与する仕組みであり, まだ教科書レベルでの解説は見かけないが, その存在が近年注目されている。Moonlightingとは「副業」を意味しており, したがってMoonlighting Proteinsとは本業以外に副業の機能を持つ多機能タンパク質のことである。ここではMoonlighting Proteinsの概要とともに, 具体例としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の多機能性について紹介する。

2. Moonlighting Proteins とは

生化学的な見地から観察すると, すべての生命現象は化学反応である。生命現象を理解するためには, 生物を構成する細胞がどのような遺伝子を発現し, そしてその翻訳産物であるタンパク質がどのような化学反応を引き起こすかを解き明かす必要がある。これまでは研究者が生物のある機能に興味を持ち, その機能を担うタンパク質を探索・同定すると, その機能がタンパク質の「本業」と認識されてきた。しかし1980年代後半ごろから, タンパク質の中には本業以外に, 別の異なる「副業 (Moonlighting)」を持つタンパク質が存在することが見つかった。このように「副業」の機能を持つタンパク質はMoonlighting Proteinsと呼ばれ, 多くのタンパク質に多機能性が存在すると認識され始めた。PiatigorskyとWistowは脊椎動物の眼のレンズにおいて構造タンパク質としての役割を果たすクリスタリンが解糖系のような生化学経路で触媒的に機能する既知の酵素であることを報告した⁴⁾。たとえばアヒルの ϵ -クリスタリンは乳酸デヒドロゲナーゼと同一であり⁵⁾, カメの τ -クリスタリンは α -エノラーゼと同一であった⁶⁾。当初, PiatigorskyはGene Sharingという用語を作って述べていたが⁷⁾, 現在ではMoonlightingが一般的に使用される用語となっている⁸⁾。他にも, 神経切除されたラット筋肉から分泌され, 脊髄や感覚神経に対する神経栄養因子として機

能するニューロロイキンは, グルコース6-リン酸をフルクトース6-リン酸に変換するホスホグルコースイソメラーゼのアミノ酸配列と高い相同性を示すことが発見され⁹⁾, その後, ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) の単球への分化を誘導する成熟誘導因子がニューロロイキンまたはホスホグルコースイソメラーゼと同一のタンパク質であると証明された¹⁰⁾。これらの発見は一つのタンパク質が一つの機能を担うという概念に照らし合わせると, 悪くいえば異端的な発見であるが, よくいえば魅力的な発見といえる。なぜなら, これらの発見以降, Moonlighting Proteinsの存在が高等動物のようなある種の生物に限られたことではなく, 細菌¹¹⁾, 酵母¹²⁾, そして植物¹³⁾でも多数の例が発見され, Moonlighting Proteinsによる生命現象の制御という新しい概念を打ち立てる上で, 大きなヒントになったといえるからである。

Moonlighting Proteinsとは, まったく関連のない複数の機能を発揮するタンパク質のことであり, タンパク質のアイソフォーム, リン酸化のような翻訳後修飾を受けて活性がON/OFFするタンパク質, 進化の過程で異なる機能を持つタンパク質をコードする遺伝子の融合により生じた多機能タンパク質, 選択的スプライシングにより生じたバリエーションタンパク質, 異なる場所で同じ機能を発揮するタンパク質, あるいは分解により異なる機能を生じたタンパク質断片は, Moonlighting Proteinsの範疇に入らない。これまでに発見されたMoonlighting Proteinsは, 以下のカテゴリーに分類され, 本業と副業の機能を切り替え, 適材適所で機能を発揮している: ①細胞内の異なる場所で異なる機能を発揮する, ②細胞外に分泌されて細胞内とは異なる機能を発揮する, ③細胞種に依存して異なる機能を発揮する, ④低分子のコファクターを結合することで異なる機能を発揮する, ⑤オリゴマー構造を変えることで異なる機能を発揮する, ⑥相互作用するパートナーを変えて異なる複合体を形成して異なる機能を発揮する, ⑦異なるリガンドをタンパク質の異なる部位に結合して異なる機能を発揮する (図1)。しかしMoonlightingな機能を証明する上では注意すべきことがある。たとえば, 研究対象とするタンパク質が予期されない場所で発見された場合, 単なる実験操作上のミスから生じたアーティファクトな結果であるかもしれない。アーティファクトな結果かどうかを精査し, 実験操作のミスがないことを証明して, ようやくMoonlightingな機能の存在の可能性を示す最初のステップにたどり着いたといえる。最終的には何かの道理的な目的, つまり生理的な (場合によっては病態生理的な) 機能を発揮するためにMoonlightingな機能が存在することを証明する必要がある。

最近, Jefferyは, 構造変化あるいは遺伝子変異が正常な機能とは異なる別のMoonlightingな機能をタンパク質に与える場合も考慮されるべきであり, そのような新しい機能をNeomorphic Moonlighting (新形質の副業) 機能と呼ぶよう提案している¹⁴⁾。構造変化によるNeomorphic Moonlight-

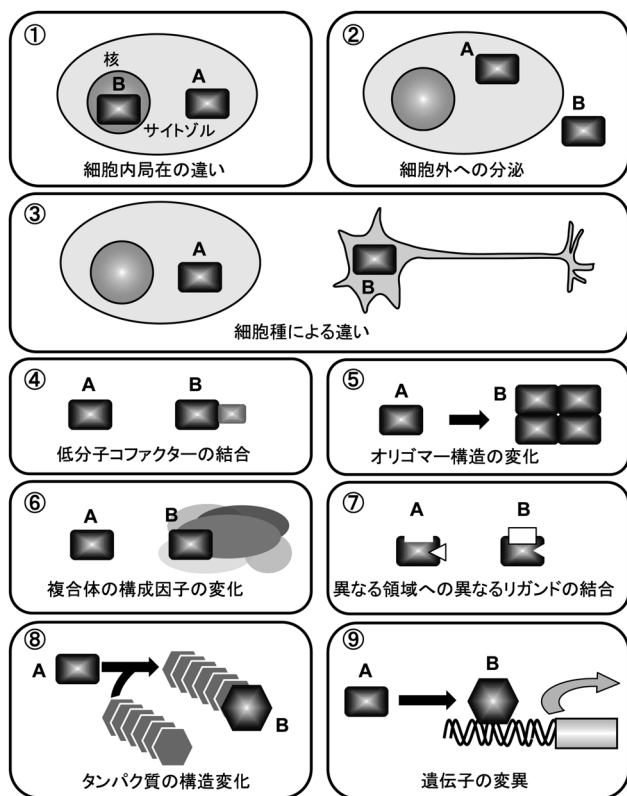


図1 Moonlighting Proteins の概要

①細胞内の異なる場所で異なる機能を発揮する, ②細胞外へ分泌されて細胞内とは異なる機能を発揮する, ③細胞種に依存して異なる機能を発揮する, ④低分子のコファクターを結合することで異なる機能を発揮する, ⑤オリゴマー構造を変えることで異なる機能を発揮する, ⑥相互作用するパートナーを変えて異なる複合体を形成して異なる機能を発揮する, ⑦異なるリガンドをタンパク質の異なる部位に結合して異なる機能を発揮する, ⑧構造変化により異なる機能を発揮する, ⑨遺伝子変異により異なる機能を発揮する。

ing 機能獲得の例としては, アルツハイマー病や全身性アミロイドシスに関わるアミロイド線維があげられる¹⁵⁾ (図1の⑧). アミロイド線維は通常は折りたたまれて安定なタンパク質として存在するが, 構造変化を受けるとオリゴマー構造の不溶性タンパク質の凝集物を形成し, 新しいタンパク結合機能を獲得する. 一方, 遺伝子変異による Neomorphic Moonlighting 機能獲得の例としては, 腫瘍抑制因子として TGF- β シグナル経路で機能する MAD ファミリータンパク質の一つである SMAD4 がある (図1の⑨). SMAD4 では遺伝子変異が起こった結果として, 正常時には結合しないプロモーターに結合して, 遺伝子発現パターンを変える. これらの Neomorphic Moonlighting 機能は病気に関連しており, 今後ますます発見されると思われる.

3. GAPDH の本業

解糖系酵素である GAPDH (EC 1.2.1.12) は, NAD^+ を補酵素としてグリセルアルデヒド 3-リン酸 (G3P) から 1,3-ビスホスホグリセリン酸への可逆的な反応を触媒する. ヒ

トでは 152 番目の Cys 残基が活性中心としてデヒドロゲナーゼ活性を触媒する. 以下で, 活性中心の Cys を 151 番目 (N 末端の Met がメチオニンアミノペプチダーゼにより除去されたものを計算した場合) または 149 番目 (ラット GAPDH の場合) と原著論文に従って記載したが, いずれも同一のサイトであり, さらに, Gly, Ala, Ser 変異体はすべて GAPDH のデヒドロゲナーゼ活性を消失している. この活性中心は酸化や NO による S-ニトロシル化修飾を受けやすく, これらの修飾を受けると GAPDH はデヒドロゲナーゼ活性を失う¹⁶⁾. N 末端側の 1~151 アミノ酸が NAD^+ への結合に, C 末端に位置する 315~335 アミノ酸が G3P との結合に関与する領域である. 解糖系の反応の場合はサイトゾルであるが, GAPDH はサイトゾルでホモ四量体を形成して解糖系酵素として機能する. 活性中心や機能ドメイン, そして多量体形成能 (単量体, 二量体, 四量体) は後述する GAPDH の多機能性に重要な役割を果たす.

“ハウスキーピング遺伝子”として, GAPDH はアクチンやチューブリンと並んで, ノーザンブロットやウェスタンブロット, RT-PCR の内部標準タンパク質として広く用いられるため, 多くの研究者にとって, 他の解糖系酵素よりもなじみが深いであろう. しかし, GAPDH は, ヒトにおける組織分布では, 最大 15 倍の発現の違いが存在することや, 低酸素環境, インスリンにより発現が亢進することから¹⁷⁻²⁰⁾, 内部標準タンパク質として万能ではない. また, このように GAPDH の発現が上昇しても解糖系における律速酵素は, ヘキソキナーゼや 6-ホスホフルクトキナーゼ 1, ピルビン酸キナーゼであるために, 直接解糖系自体が促進され ATP の産生が増加するものではないと考えられる. 我々は, 低酸素環境下における血管内皮細胞において, GAPDH タンパク質の発現上昇に伴って GAPDH 活性が上昇しないことを見いだしている¹⁸⁾. つまり, GAPDH は解糖系酵素として以外の需要によりその発現が誘導されると考えられる. 逆に, 培養細胞における RNAi 実験のトレーニングキットとして GAPDH を標的とした siRNA が市販され広く用いられていることから, 細胞内の GAPDH 発現を抑制してもエネルギー産生に大きな影響がないことがうかがえる. このような観点から, 細胞内のタンパク質量の 10~20% を占め²⁰⁾, 細胞内に著量発現する GAPDH は, 平時においても解糖系酵素以外の Moonlighting な機能を持ち合わせていることが想像できるであろう. さらに広くエネルギー産生系の酵素に目を移してみると, 実に 10 種類の解糖系酵素のうち 7 種類で, 8 種類のクエン酸回路の酵素のうち 7 種類で Moonlighting な機能が報告されている²¹⁾. 一方で, 解糖系酵素の最も重要な制御因子となる 6-ホスホフルクトキナーゼ 1 は, 副業が知られていない 3 種類のうちのひとつである. つまり, 何らかの刺激によって, 細胞内のエネルギー産生系の酵素が増加したとしても, 律速段階を調節するものでない場合, エネルギー産生の増加への寄与よりも副業を疑ってみる必要があるのではないだろうか.

4. GAPDHの副業

GAPDHは、細胞質ではサイトゾル、ポリソーム、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、さらに、核、細胞膜、細胞外（血液も含む）に存在する多局在性タンパク質である。GAPDHの核移行シグナルは明らかになっていないが、核移行にはいくつかのLys残基のアセチル化が必要である^{22, 23)}。一方、GAPDHは、核外移行シグナルを持ちCRM1依存的に核から細胞質に移行する²⁴⁾。GAPDHの核への局在には細胞周期も重要であり、特にS期では核に局在する割合が高い²⁵⁾。ここでは、細胞内外の局在を交えながら、GAPDHのMoonlightingな機能を上記のカテゴリーに分類し、Neomorphic Moonlightingな機能とともに紹介する。

1) 核酸結合を介した作用

GAPDHは、DNA結合タンパク質として早い時期に同定され、核酸との結合を介した多様な作用が明らかになっている²⁰⁾。GAPDHと染色体DNAの結合は非常に強く、塩濃度を5 Mまで上昇させても解離しない²⁶⁾。GAPDHは、NAD⁺結合構造であるロスマンフォールド (Rossmann fold) を介して核酸と結合することができる (分類①④)。

・DNA修復

GAPDHは核においてそれ自身が直接ウラシル-DNAグリコシラーゼとして機能することでDNA修復酵素として働く^{20, 27)}。このときGAPDHは単量体として作用し、四量体にはウラシル-DNAグリコシラーゼ活性がない (分類①⑤)。さらに、GAPDHはDNA修復酵素である脱プリン脱ピリミジンエンドヌクレアーゼ (APE1) に結合して酸化型のAPE1を還元型に変換することで、APE1のDNA修復活性を回復させ間接的にDNA修復に寄与する²⁴⁾。活性中心変異体GAPDH (C152G) はAPE1に結合することができるが、還元型への変換作用を失っており、DNA修復に作用しない (分類①⑥)。

・tRNA輸送

GAPDHはロスマンフォールドを介してtRNAと結合する (tRNA^{Phe}との結合は $K_d=10^{-7}$ M)²⁰⁾。ラマンとCD分光による解析では、tRNAがGAPDH四量体の溝に入り込むモデルが提唱されている²⁸⁾。ロスマンフォールドは四量体の溝に存在することから、両者の結果は矛盾しない。GAPDHは、核外移行作用を失わせたtRNAと結合しないことから、tRNAの核外移行に関与すると考えられている (分類①④)。

・mRNA安定性の調節

細胞質でGAPDHは、ポリソームに局在して、RNAのAU-rich領域に結合する^{20, 24, 29)}。このGAPDHのAU-rich領域への結合にはロスマンフォールドが重要である。コロンイ刺激因子-1では、mRNAのAU-rich領域にGAPDHが結合することでmRNAの安定性が増加して、がんの進行を促進する。血管収縮ペプチドであるエンドセリン-1では、GAPDHが結合することでmRNAの分解が促進され血管収

縮を阻害することが考えられる。エンドセリン-1 mRNAへの結合はGAPDHの活性中心の変異体でも野生型と同レベルで観察されるが、S-ニトロシル化修飾を受けると結合活性が低下する。エンドセリン-1 mRNAへの結合には、NAD⁺結合領域 (ロスマンフォールド) あるいは基質結合領域のみでは不十分で、全長のGAPDHが必要である。つまり、GAPDHの核酸への結合様式は一様ではない。アンギオテンシンIIタイプ1受容体では、mRNAの3'-UTRにGAPDHが結合しその翻訳を阻害することで、血圧や心血管疾患に関与することが考えられる (分類①③④⑦)。

・テロメアへの作用

GAPDHは、*in vitro*において、一本鎖あるいは二本鎖テロメアDNAに結合する²⁵⁾。三つの繰り返しからなる一本鎖テロメアDNAへの結合は、 $K_d=45$ nMと親和性も高い。テロメアDNAへの結合は、ロスマンフォールド変異体 (D32A) のみならず、活性中心変異体 (C149A) でも低下する。さらに、核内GAPDHは、細胞質GAPDHよりもテロメアDNAにより強固に結合するが、これは、核内には結合の強い単量体が多いためである。GAPDHはテロメアDNAへの結合により、ヒト肺がん細胞株A549細胞では薬剤によるテロメアの分解を阻害する²⁹⁾。一方で、乳がん細胞株MCF-7において、GAPDHはテロメラーゼRNA構成要素に結合してテロメラーゼ活性を抑制し、MCF-7細胞の老化を促進する³⁰⁾。GAPDHのテロメラーゼRNA構成要素への結合にはロスマンフォールドが必要であり、テロメラーゼ活性の阻害にはGAPDHのC末端側に存在するK260が重要である。NAD⁺やG3P、さらに活性中心をS-ニトロシル化させるS-ニトロソグルタチオン (GSNO) はGAPDHのテロメラーゼ活性阻害作用を抑制する (分類①④⑤)。このように、GAPDHのテロメアへの影響は細胞種によって相反しており、さらなる研究成果が待たれる。

2) 転写調節作用

酵母においては、RNAポリメラーゼIIに結合することや³¹⁾、培養細胞においてもGAPDHにGAL4 DNA結合ドメインを融合させるとGAL4を介した転写が活性化することから、GAPDH自身が転写活性化ドメインを持つ可能性がある³²⁾ (分類①⑥)。

・Oct-1の転写促進作用

GAPDHは、核内でOct-1コアクチベーター複合体であるOCA-Sに結合して、S期におけるヒストン2Bの合成を促進する。GAPDHのOCA-Sへの結合とOCA-Sの機能亢進作用は、NAD⁺の濃度に依存する²⁹⁾ (分類①④⑥)。ヒストン八量体 (H2A, H2B, H3, H4) の発現調節は協調的に行われS期の進行に必要であること³³⁾、GAPDHの核内局在はS期に増えることから²⁵⁾、GAPDHはS期の進行に重要であると考えられる。また、複数のがん細胞において正常細胞よりもGAPDHの発現が亢進しているが²⁰⁾、がん細胞におけるGAPDHの発現亢進がS期を進行させて細胞増殖促進に寄与するか否かは明らかでない。

・アンドロゲン受容体 (AR) の転写促進作用

GAPDHは前立腺がん細胞において、アンドロゲン受容体 (AR) の転写活性を上昇させる³⁴⁾。GAPDHとARの複合体はサイトゾルと核内の両方で形成されるが、核移行シグナルを融合させ核にのみGAPDHを発現させた場合では、AR転写活性の促進がみられないことから、細胞質でARと複合体を形成して、核に移行することが転写活性促進に必要である。活性中心変異体 (C151S) でも野生型と同レベルの転写活性促進作用を持つことから、転写活性促進にデヒドロゲナーゼ活性は関与しない (分類①③⑥)。前立腺がんでは、グルココルチコイド受容体やエストロゲン受容体の転写活性は促進しないが、最近、転写活性への影響は明らかでないものの、乳腺上皮細胞のナトリウム依存性中性アミノ酸トランスポーター2プロモーターでエストロゲン受容体の転写複合体にGAPDHが含まれることが判明した³⁵⁾。これらの結果から、GAPDHはある種の細胞ではエストロゲン受容体の転写調節に関係する可能性がある (分類①③⑥)。

3) 細胞の生死に関する作用

・アポトーシス惹起作用

GAPDHは、神経細胞死に先んじて高発現し、核内に移行する²⁶⁾。GAPDHはp53によって発現が誘導されるため、p53の下流でアポトーシスの誘導を促進する可能性がある。その作用機構としては、まずGAPDHの活性中心のCysがS-ニトロシル化されると、ユビキチンリガーゼであるSiah1と結合する³⁶⁾。Siah1はGAPDHとの結合により安定化し、Siah1の核内移行シグナルを利用して核内に移行して核内タンパク質をユビキチン化させて分解に導く。核内GAPDHがp300/CBPと結合してp300/CBPを安定化させアセチル化を誘導することでアポトーシスを誘導する機構も提唱されている。一方で、GAPDHとSiah1の結合を阻害するタンパク質 (GOSPEL) も見いだされている^{22, 29)} (分類①③④⑥)。

ストレス環境下で、GAPDHはミトコンドリアに移行し、ミトコンドリア外膜に局在する電位依存性陰イオンチャネルと結合して、シトクロムcの漏出を促進することでアポトーシスを促進する³⁷⁾。このように、GAPDHのアポトーシスに関する作用としては、核やミトコンドリアへの移行を伴い、綿密に制御されていることがうかがえる (分類①⑥)。

・神経変性疾患における作用

GAPDHは、アルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイドβ前駆体タンパク質や、トリプレットリピート病の原因タンパク質であるハンチンチンやAR, SCA-1やアタキシシン-1, DRPLAタンパク質と結合する^{20, 37)}。また、GAPDHは、パーキンソン病においてレビー小体に含まれる³⁸⁾。GAPDHは細胞外に放出されて神経細胞に沈着し、凝集体を形成する。興味深いことに、GAPDH自身の凝集がアミロイドβの凝集を促進する³⁹⁾。これはGAPDHが凝

集体となることで、機能性を獲得するNeomorphic機能を持つことを提示した例である。GAPDHの凝集には活性中心のCysが必須であり、酸化ストレスによる神経細胞死にも関与する⁴⁰⁾ (分類②③⑥⑧)。パーキンソン病の治療薬であるデプレニルは、GAPDHと直接結合して活性中心のS-ニトロシル化を阻害し、Siah1との結合を阻害する⁴¹⁾ (分類⑦)。

4) リン酸化酵素活性を介した作用

GAPDH四量体はMg²⁺-ATPの存在下で、自己リン酸化することからリン酸基転移活性を有することが知られる²⁰⁾。一方で、NAD⁺、NADHやG3P存在下で脱リン酸化する。GAPDHのリン酸基転移活性は、GABA(A)受容体のSer/Thr残基をリン酸化する⁴²⁾。G3PはGAPDHの自己リン酸化レベルを抑制するがGABA(A)受容体のリン酸化には必須である。ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (nm23) は、GAPDH二量体と結合することで活性化する³⁷⁾。また、GAPDHはnm23と結合しても、デヒドロゲナーゼ活性が低下しない (分類④⑤⑥)。

5) 細胞骨格への作用

GAPDHはチューブリンやアクチンに結合する²⁰⁾。GAPDH二量体と四量体はともに微小管に結合するが、四量体のみが微小管束の形成を促進する⁴³⁾。これは、GAPDHの四量体がATPの結合によって解離することを利用して証明された。GAPDHは微小管へ結合することで多量体形成能を失い、デヒドロゲナーゼ活性が消失する⁴⁴⁾。一方で、微小管結合に伴うデヒドロゲナーゼ活性の消失は、NAD⁺によって回復する (分類①⑤⑥)。

6) 小胞輸送に関する作用

GAPDHは、低分子量Gタンパク質のRab2と結合して^{22, 29, 45)}、小胞体からゴルジ体への物質輸送に関与する。Rab2と結合したGAPDHは、srcやタンパク質キナーゼCiによりリン酸化される。GAPDHがこれらのリン酸化修飾を受けることが小胞体からゴルジ体への物質輸送に重要である (分類①⑥)。

7) 酸素センシング作用

赤血球では、GAPDHの60~70%が細胞膜に局在し、陰イオン交換体であるバンド3に結合した状態やリン脂質二重膜の一部として存在する²⁰⁾。GAPDHは、活性中心がS-ニトロシル化されることで赤血球膜から解離する。GAPDHとバンド3との結合は、局所における酸素センシング機能に関与し、ヘモグロビンから酸素分子の解離を促進させる⁴⁶⁾ (分類①③⑥)。細胞膜に局在するGAPDHは、脂質二重膜の融合促進やエンドサイトーシスにも作用する²⁰⁾。

8) 細胞外における作用

GAPDHは細胞外に放出され、細胞伸展を阻害する。このとき、細胞への接着に活性中心のCysが関与すること、そ

してGAPDHは血液中にも存在することが判明している⁴⁷⁾ (分類②). 細胞外GAPDHは、ハイブリドーマ細胞からのIgMの分泌を促進する⁴⁸⁾ (分類②). マクロファージにおいて、GAPDHは細胞内鉄イオンの減少を感知して細胞膜表面に移行してトランスフェリンの受容体として機能し、エンドサイトーシスによるトランスフェリンの取り込みを促進することで、鉄の取り込みに寄与する^{29, 49)} (分類②⑥).

細菌の菌体外表面のGAPDHは、腸管内でのプロバイオティクスに影響する。多くのグラム陽性細菌の菌体外表面にGAPDHが存在することが観察され、動物の腸管内でこれらの細菌は、菌体外GAPDHを介してpH依存的に宿主の細胞に結合する^{50, 51)}。 *Lactobacillus* 属の菌体外表面GAPDHは、大腸から単離したムチンや糖鎖末端に存在する血液型抗原に結合する^{52, 53)}。一方で、*Candida* 属の菌体外表面GAPDHはフィブロネクチンやラミニンに結合する⁵⁴⁾。このように、菌体外表面のGAPDHは糖鎖構造や細胞接着因子を認識してアドヘンシと呼ばれる腸管付着因子として機能する (分類②⑥⑦)。さらに、血栓溶解酵素の前駆体であるプラスミノゲンの活性化作用を持つことから、直接ヒトの生理作用に影響する⁵⁴⁾。

5. おわりに

Moonlighting Proteins の代表例としてGAPDHの機能について紹介した (図2)。GAPDHの活性中心は細胞内外からの細胞膜への結合、細胞内局在の変化、そして凝集体の形成に、ロスマンフォールドは核酸との結合に、G3P結合領域と多量体の形成はデヒドロゲナーゼ活性のみならず、グリコシラーゼ活性、リン酸基転移活性の調節に寄与する。GAPDHの発現レベルが高いのは、このような多機能性を持つことに起因するのかもしれない。GAPDHは哺乳類に限らず、細菌、酵母、植物といったようにほとんどすべての生物で発現している。近年、細菌で知られていたGAPDHのトランスフェリン受容体としての機能が、哺乳類でも保存されていることが判明した^{49, 54)}。このように

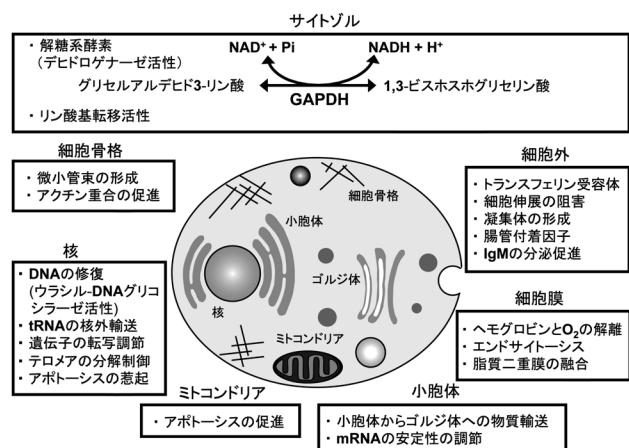


図2 GAPDHの多様な機能
細胞内外におけるGAPDHの局在とMoonlightingな機能を示す。

文 献

- 1) Beadle, G.W. & Tatum, E.L. (1941) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **27**, 499–506.
- 2) Pennisi, E. (2000) *Science*, **288**, 1146–1147.
- 3) International Human Genome Sequencing Consortium (2004) *Nature*, **431**, 931–945.
- 4) Piatigorsky, J. & Wistow, G.J. (1989) *Cell*, **57**, 197–199.
- 5) Hendriks, W., Mulders, J.W., Bibby, M.A., Slingsby, C., Bloemendal, H., & de Jong, W.W. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7114–7118.
- 6) Wistow, G.J., Lietman, T., Williams, L.A., Stapel, S.O., de Jong, W.W., Horwitz, J., & Piatigorsky, J. (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 2729–2736.
- 7) Piatigorsky, J., O'Brien, W.E., Norman, B.L., Kalumuck, K., Wistow, G.J., Borras, T., Nickerson, J.M., & Wawrousek, E.F. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3479–3483.
- 8) Jeffery, C.J. (1999) *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 8–11.
- 9) Chaput, M., Claes, V., Portetelle, D., Cludts, I., Cravador, A., Burny, A., Gras, H., & Tartar, A. (1988) *Nature*, **332**, 454–455.
- 10) Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T., & Chiao, J.W. (1996) *Blood*, **87**, 4502–4506.
- 11) Wang, G., Xia, Y., Cui, J., Gu, Z., Song, Y., Chen, Y.Q., Chen, H., Zhang, H., & Chen, W. (2013) *Curr. Issues Mol. Biol.*, **16**, 15–22.
- 12) Gancedo, C. & Flores, C.L. (2008) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 197–210.
- 13) Moore, B. (2004) *Trends Plant Sci.*, **9**, 221–228.
- 14) Jeffery, C.J. (2011) *IUBMB Life*, **63**, 489–494.
- 15) Chiti, F. & Dobson, C.M. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 15–22.
- 16) Schuppe-Koistinen, I., Moldeus, P., Bergman, T., & Cotgreave, I.A. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **221**, 1033–1037.
- 17) Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., & Clark, B.J. (2005) *Physiol. Genomics*, **21**, 389–395.
- 18) Yamaji, R., Fujita, K., Takahashi, S., Yoneda, H., Nagao, K., Masuda, W., Naito, M., Tsuruo, T., Miyatake, K., Inui, H., & Nakano, Y. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1593**, 269–276.
- 19) Higashimura, Y., Nakajima, Y., Yamaji, R., Harada, N., Shibasaki, F., Nakano, Y., & Inui, H. (2011) *Arch. Biochem. Biophys.*, **509**, 1–8.
- 20) Sirover, M.A. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1432**, 159–184.
- 21) Sriram, G., Martinez, J.A., McCabe, E.R., Liao, J.C., & Dipple, K.M. (2005) *Am. J. Hum. Genet.*, **76**, 911–924.
- 22) Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T.W., & Sawa, A. (2011) *Cell. Signal.*, **23**, 317–323.
- 23) Ventura, M., Mateo, F., Serratos, J., Salaet, I., Carujo, S., Bachs, O., & Pujol, M.J. (2010) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 1672–1680.
- 24) Nicholls, C., Li, H., & Liu, J.P. (2012) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **39**, 674–679.
- 25) Sundararaj, K.P., Wood, R.E., Ponnusamy, S., Salas, A.M., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., & Ogretmen, B. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 6152–6162.
- 26) Sawa, A., Khan, A.A., Hester, L.D., & Snyder, S.H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11669–11674.
- 27) Meyer-Siegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J.K., & Sirover, M.A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8460–8464.

- 28) Carmona, P., Rodriguez-Casado, A., & Molina, M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1432**, 222–233.
- 29) Sirover, M.A. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 741–751.
- 30) Nicholls, C., Pinto, A.R., Li, H., Li, L., Wang, L., Simpson, R., & Liu, J.P. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13308–13313.
- 31) Mitsuzawa, H., Kimura, M., Kanda, E., & Ishihama, A. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 48–52.
- 32) Kim, S., Lee, J., & Kim, J. (2007) *Biochem. J.*, **404**, 197–206.
- 33) Osley, M.A. (1991) *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 827–861.
- 34) Harada, N., Yasunaga, R., Higashimura, Y., Yamaji, R., Fujimoto, K., Moss, J., Inui, H., & Nakano, Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 22651–22661.
- 35) Velazquez-Villegas, L.A., Ortiz, V., Strom, A., Torres, N., Engler, D.A., Matsunami, R., Ordaz-Rosado, D., Garcia-Becerra, R., Lopez-Barradas, A.M., Larrea, F., Gustafsson, J.A., & Tovar, A.R. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 11443–11448.
- 36) Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., & Sawa, A. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 665–674.
- 37) Butterfield, D.A., Hardas, S.S., & Lange, M.L. (2010) *J. Alzheimers Dis.*, **20**, 369–393.
- 38) Tatton, N.A. (2000) *Exp. Neurol.*, **166**, 29–43.
- 39) Nakajima, H., Amano, W., Fujita, A., Fukuhara, A., Azuma, Y.T., Hata, F., Inui, T., & Takeuchi, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 26562–26574.
- 40) Nakajima, H., Amano, W., Kubo, T., Fukuhara, A., Ihara, H., Azuma, Y.T., Tajima, H., Inui, T., Sawa, A., & Takeuchi, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 34331–34341.
- 41) Hara, M.R., Thomas, B., Cascio, M.B., Bae, B.I., Hester, L.D., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Sawa, A., & Snyder, S.H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3887–3889.
- 42) Laschet, J.J., Minier, F., Kurcewicz, I., Bureau, M.H., Trottier, S., Jeanneteau, F., Griffon, N., Samyn, B., Van Beeumen, J., Louvel, J., Sokoloff, P., & Pumain, R. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 7614–7622.
- 43) Huitorel, P. & Pantaloni, D. (1985) *Eur. J. Biochem.*, **150**, 265–269.
- 44) Durrieu, C., Bernier-Valentin, F., & Rousset, B. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, **252**, 32–40.
- 45) Tisdale, E.J., Kelly, C., & Artalejo, C.R. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 54046–54052.
- 46) Kinoshita, A., Tsukada, K., Soga, T., Hishiki, T., Ueno, Y., Nakayama, Y., Tomita, M., & Suematsu, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 10731–10741.
- 47) Yamaji, R., Chatani, E., Harada, N., Sugimoto, K., Inui, H., & Nakano, Y. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1726**, 261–271.
- 48) Sugahara, T., Shirahata, S., Sasaki, T., & Murakami, H. (1995) *FEBS Lett.*, **368**, 92–96.
- 49) Rajee, C.I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J.S., & Rajee, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 3252–3261.
- 50) Jin, H., Song, Y.P., Boel, G., Kochar, J., & Pancholi, V. (2005) *J. Mol. Biol.*, **350**, 27–41.
- 51) Antikainen, J., Kuparinen, V., Lahteenmaki, K., & Korhonen, T.K. (2007) *J. Bacteriol.*, **189**, 4539–4543.
- 52) Kinoshita, H., Uchida, H., Kawai, Y., Kawasaki, T., Wakahara, N., Matsuo, H., Watanabe, M., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A., & Saito, T. (2008) *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 1667–1674.
- 53) Kinoshita, H., Wakahara, N., Watanabe, M., Kawasaki, T., Matsuo, H., Kawai, Y., Kitazawa, H., Ohnuma, S., Miura, K., Horii, A., & Saito, T. (2008) *Res. Microbiol.*, **159**, 685–691.
- 54) Henderson, B. & Martin, A. (2011) *Infect. Immun.*, **79**, 3476–3491.

著者寸描

●原田 直樹 (はらだ なおき)



大阪府立大学大学院生命環境科学研究科講師。博士（農学）。

■略歴 1980年岡山県に生る。2002年大阪府立大学農学部卒業。04年同大学院農学生命科学研究科博士前期課程修了。同年東洋水産株式会社。07年大阪府立大学大学院農学生命科学研究科博士後期課程修了。博士（農学）。08年同大学院生命環境科学研究科助教。15年より現職。

■研究テーマと抱負 GAPDHの新規機能として見出したアンドロゲン受容体の転写調節の研究を進展させて、現在は、糖・脂質代謝における男性ホルモンシグナルの役割の解明に取り組んでいます。

■ウェブサイト <http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/NC/>

■趣味 メダカ。

●三谷 壘一 (みたに たかかず)



神戸大学大学院農学研究科日本学術振興会特別研究員（PD）。博士（応用生命科学）。

■略歴 1984年大阪府に生る。2008年大阪府立大学農学部卒業。10年同大学院生命環境科学研究科博士前期課程修了。11年日本学術振興会特別研究委員（DC2）。13年大阪府立大学大学院生命環境科学研究科博士後期課程修了。13年神戸大学自

然科学系先端融合研究環学術推進研究員。14年より現職。

■研究テーマと抱負 性ホルモンが関与する疾病の分子メカニズムを解明する研究。生命現象には細胞レベルでは有益であっても、個体レベルでは有害であることが多々存在する。この矛盾する現象を理解し、外部刺激によって調節可能にすることを旨とする。

■趣味 離島巡り、読書、ドライブ。

●山地 亮一 (やまじ りょういち)



大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授。博士（農学）。

■略歴 1965年大阪に生る。88年大阪府立大学農学部農芸化学学科卒業。90年同大学院農学研究科博士前期課程農芸化学専攻修了。92年同大学農学部助手。98～2000年米国NIHポスドク。12年より現職。

■研究テーマと抱負 Moonlightingを常に意識しつつ、メタボリックシンドロームとロコモティブシンドロームを予防するために、骨格筋を質的・量的に維持・増加する分子機構を研究しています。

■ウェブサイト <http://www.biochem.osakafu-u.ac.jp/NC/>

■趣味 映画・ドラマ鑑賞。