

活性酸素種の感知とシグナル伝達機構

岩井 健太, 久下 周佐

Sensing of Reactive Oxygen Species and The Signal Transduction

Kenta IWAI and Shusuke KUGE

(Received November 20, 2010)

はじめに

呼吸に用いられる酸素は最終的に水に還元されるが、その数%は部分還元体である活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) として残存する。ROS は薬剤, 紫外線, 放射線等の外的要因によっても発生し, 酸化修飾により生体分子の機能に影響を与え, 発がんや老化をはじめ様々な病態に深く関与すると考えられている。¹⁻⁴⁾ このように毒性面が強調される一方で, 近年, ROS には生理的な役割があることが明らかになってきた。哺乳動物細胞においては増殖因子やサイトカイン応答の過程で発生し, そのシグナル応答に必要な分子であること, すなわちシグナル分子として機能することが報告された。⁵⁾

細胞内において酸素分子を利用する主要な場所は, ミトコンドリアの呼吸鎖である (Fig. 1)。呼吸の過程で一電子還元され生成したスーパーオキシドは, ミトコンドリアマトリックス内 (内膜内側) に存在するスーパーオキシドディスムターゼ (Mn-SOD), 細胞質およびミトコンドリア外膜内に存在

するスーパーオキシドディスムターゼ (Cu, Zn-SOD) による不均化反応で過酸化水素に変換される。過酸化水素は両親媒性であることから膜透過性が高く, ROS 中では安定性が高いため細胞内に比較的高濃度に存在すると考えられている。また, 過酸化水素そのものにも, 生理活性や毒性があることからその存在量を感知し制御する必要がある。一方, スーパーオキシドは脂質を過酸化して細胞毒性のある脂質過酸化物質を生成する。これら過酸化物質を消去する因子としてカタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ (Gpx), ペルオキシレドキシン (Prx/Prdx) やヘムオキシゲナーゼ (HO) などの抗酸化因子が挙げられるが, これらの多くは酸化ストレス (ROS によるストレス) により誘導され過酸化水素濃度を制御する役者として機能する。⁴⁾

それでは, 細胞がどのように過酸化水素を感知し, シグナルとして特異的遺伝子発現 (ストレス応答) や細胞制御を行っているのか? 我々は出芽酵母を用いて過酸化水素感知と特異的誘導機構の研究を進めた結果, 過酸化水素 (過酸化物質)

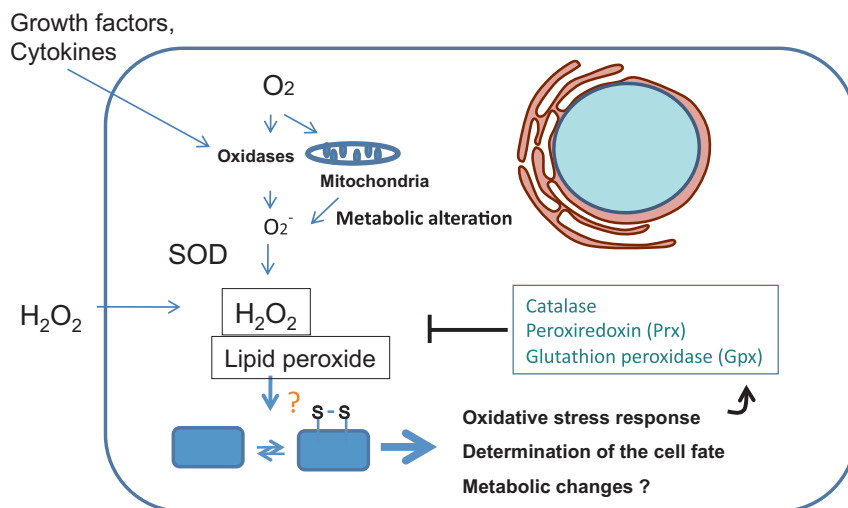


Fig. 1. Production and removal of reactive oxygen species in eukaryotic cells

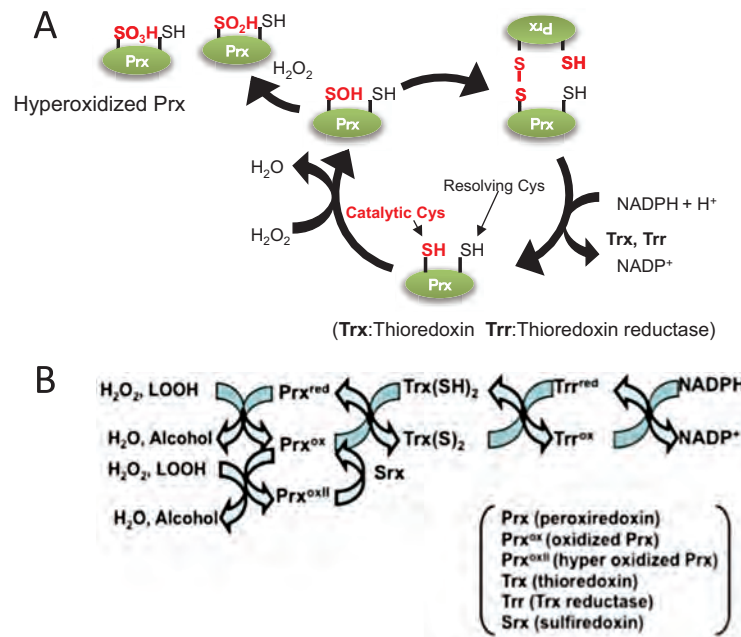


Fig. 2. NADPH and peroxide-dependent redox (reduction-oxidation) reaction of Peroxiredoxin

A, A catalytic cysteine of peroxiredoxin (Prx) is first oxidized to sulfenic acid, and then a disulfide bond between the catalytic cysteine and a resolving cysteine is formed. A higher concentration of hydrogenperoxide results in hyperoxidation of Prx. B, Redox cycle of Prx depends on thioredoxin (Trx) reduction system.

の感知にペルオキシレドキシシが重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。⁶⁻⁹⁾ ペルオキシレドキシシは、近年、過酸化水素消去因子というよりはむしろ細胞内過酸化水素のレベルを制御する因子として注目されている。我々の研究成果は、さらに進んで、過酸化物質を受容して他の分子に伝達するという、ROSによるシグナル伝達経路においてペルオキシレドキシシが積極的かつ重要な役割を担っている可能性を示している。

I. ペルオキシレドキシシによる過酸化水素消去反応とチオール-ジスルフィド交換連鎖反応

ペルオキシレドキシシは、原核生物から高等真核生物まで高度に保存されているチオレドキシシペルオキシダーゼとして知られている。Fig. 2に示すように、ペルオキシレドキシシの酸化反応は過酸化物質により酸化を受けやすいシステイン残基(触媒システイン)が、まずスルフェン酸に酸化された後に分子内にあるもう一方のシステイン残基(リゾルビグシステインと呼ばれる)と分子内で、またはホモダイマー分子間でジスルフィド結合を形成する。¹⁰⁾ このように酸化された(ジスルフィド型)ペルオキシレドキシシは、チオレドキシシ(Trx)による還元を受ける。この際、形成された

ジスルフィド型チオレドキシシはチオレドキシシレダクターゼ(Trr)により一分子のNADPH(+H⁺)から電子を受け取ることによって還元型に戻される(Fig. 2B)。前述した過酸化物質を消去するグルタチオンペルオキシダーゼの場合は、グルタチオンの酸化還元反応を介して同様にNADPHの還元当量を消費することで過酸化反応を終結する。ペルオキシレドキシシはこのように抗酸化因子として機能するが、ペルオキシレドキシシの活性中心のシステインは、非常に高い反応性を持つために、高濃度の過酸化水素によりスルフェン酸またはスルホン酸に過酸化され活性を失うことから抗酸化因子としての機能には不明な点が多い(Fig. 2A)。¹¹⁾ 一方、最近、ペルオキシレドキシシは、ROSレベルの閾値を決定しそれを超えたROSがシグナル伝達に寄与するというフラッドゲートモデルが提唱されている。¹¹⁾

II. 出芽酵母の酸化ストレス応答機構

我々は、過酸化物質の感知機構を明らかにするため、出芽酵母の酸化ストレス応答の研究を行ってきた。出芽酵母は過酸化物質や親電子性物質の存在に反応して抗酸化因子を誘導発現する。すなわち酸化ストレス応答である。この酸化ストレス応答に中心的に機能するのは、yeast AP-1様転写

因子として同定された Yap1 である。Yap1 は過酸化水素などの酸化剤処理によって活性化されるが、細胞質-核間の分布の制御というユニークな機構を介して活性化が制御されている。¹²⁾ 非ストレス条件下では Yap1 は細胞質-核間を往來し活性が低く保たれているが、過酸化物が負荷されると Yap1 分子内にジスルフィド結合が形成される。^{13,14)} このジスルフィド結合は Yap1 の立体構造変化を引き起こし Yap1 の核外輸送シグナルを隠蔽し、核外輸送受容体 Crm1 との相互作用阻害をもたらす結果、核に蓄積し転写活性が亢進される。¹⁵⁻¹⁷⁾ Yap1 のジスルフィド結合形成には glutathione peroxidase 3 (Gpx3)¹⁸⁾ および Yap1-binding protein (Ybp1)¹⁹⁾ が必要であることが報告された。Gpx3 は Yap1 に特異的な過酸化水素受容体と位置付けられたが、幸か不幸か我々が使用していた酵母株の YBP1 遺伝子には変異があり、Gpx3 ではなく主要ペルオキシレドキシシンである Tsa1 が過酸化水素を受容して Yap1 にジスルフィド結合形成を誘導することを明らかにした。⁶⁾

Ⅲ. 出芽酵母ペルオキシレドキシシンファミリー分子は過酸化物レセプターとしての機能する

酵母主要ペルオキシレドキシシン Tsa1 が過酸化物の受容体として機能することから、次に、我々は、他のペルオキシレドキシシン分子種にも同様な機能

がある可能性を追求した。ヒト細胞には6種のペルオキシレドキシシンファミリー分子種が存在し、細胞内分布が異なるなど多様性がある。一方、出芽酵母にも5種 (Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1, Dot5) が存在し、それぞれの細胞内分布、発現パターン、過酸化物に対する反応性および反応の至適 pH などが分子種によって異なる。^{20,21)} 従って、それぞれのペルオキシレドキシシンが発生源を異にする過酸化水素や異なった過酸化物質分子種と反応する可能性や、それぞれのペルオキシレドキシシンに特異的な標的タンパク質にジスルフィド結合形成を誘導することでそのシグナルを伝達する可能性が考えられる。また、ペルオキシレドキシシンの本質的な機能を解析するために出芽酵母の系は哺乳動物細胞の良いモデルとなると考えた。そこで、過酸化水素ではなく有機過酸化物である tertiary-butylhydroperoxide (tBOOH) 反応性が高いユニークなペルオキシレドキシシンである Ahp1 に着目して検討を行った。Ahp1 を欠損した酵母は tBOOH に感受性になることが報告されている。²²⁾

Ahp1 の標的分子を取得するために、ペルオキシレドキシシンと標的分子の相互作用機構を理解することが重要である。我々は、ペルオキシレドキシシンによる過酸化物質を受容と標的分子のジスルフィド結合形成の機構として次のモデルを提唱している (Fig. 3A)。⁸⁾ すなわち、1) ペルオキシレ

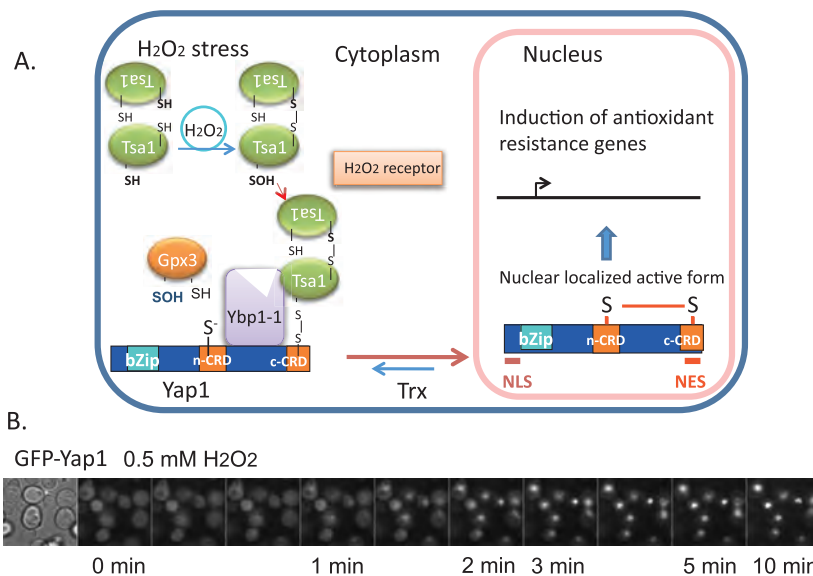


Fig. 3. Nuclear localization of Yap1, a master transcription factor of budding yeast or oxidative stress is induced in response to hydroperoxides

A, Disulfide bonds forming in Yap1 in response to hydroperoxides inhibit a nuclear export signal (NES) of Yap1. Yap1 accumulation in the nucleus results in induction of genes involved in antioxidant resistance. In *ybp1-1* mutant cells, a major Prx Tsa1 acts as a receptor for hydroperoxide to induce disulfide bond formation of Yap1. B, Nuclear distribution of GFP-fused Yap1 a induced in response to oxidative stress.

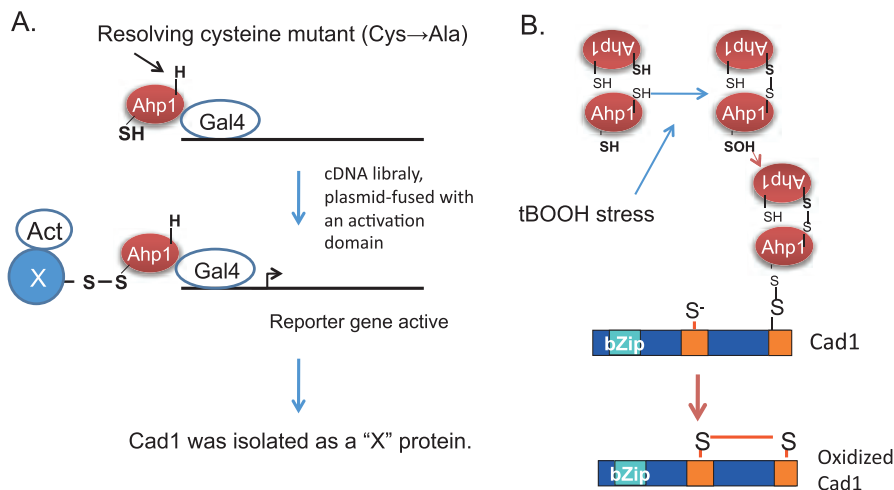


Fig. 4. Cad1 transcription factor is a specific target protein of Ahp1

A. We established a Two-hybrid screening system to isolate proteins that can interact to a catalytic cysteine of Ahp1 via a disulfide bond. B. Cad1 is an Ahp1-target molecule.

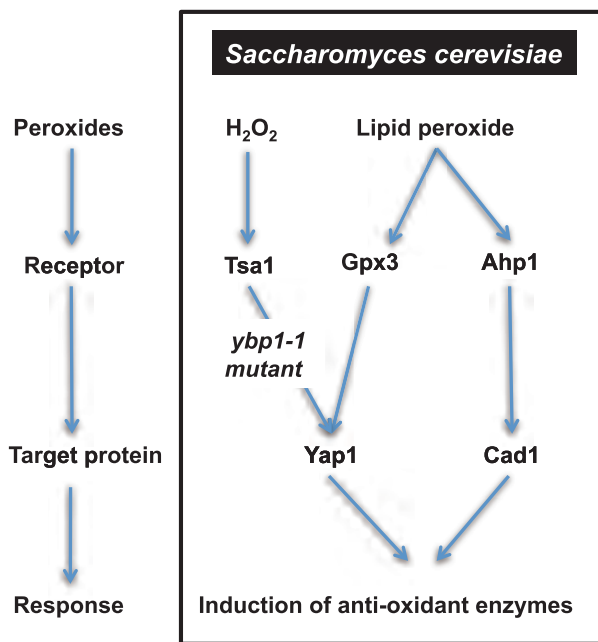


Fig. 5. Peroxiredoxins are receptors for hydroperoxides, and are transducers that modulate activity of specific target molecules

We postulate that each Prx family proteins can act as receptors for peroxides to transduce peroxide signals. We designate the signaling pathway as "Prx-induced redox signal systems".

ドキシンの活性部位のシステイン残基が過酸化物質によりスルフェン酸に酸化され、2) 次にこの残基が標的分子のシステイン残基と一過的にジスルフィド結合を形成する。3) さらに標的分子の他のシステイン残基のチオレートアニオンがこのジスルフィド結合にアタックすることで標的分子内のジスルフィド結合が形成される、というモデ

ルである。Tsa1によるYap1のジスルフィド結合の誘導機構の例をFig. 3Aに示す。このモデルを基盤として、Ahp1の標的分子を同定する方法として、Ahp1の活性部位のシステイン残基と特異的にジスルフィド結合を形成する因子をTwo-hybrid法を用いて検索した。その結果、転写因子Cad1(Yap2)を同定することに成功した(Fig. 4)。⁹⁾ Cad1は前述したYap1と類似した構造を持つ転写因子で、²³⁾ Ahp1は過酸化物質の中でも特に脂質酸化物質を感知し、ジスルフィド交換反応を介してCad1の活性を制御することを明らかにした。⁹⁾ このことは、ペルオキシレドキシファミリーには過酸化物質除去活性以外にも過酸化物質を感知し標的分子に伝達するという本質的な機能を有する可能性を強く支持するものである(Fig. 5)。

おわりに

ヒト細胞においても6種のペルオキシレドキシが存在している。この中でPrdx1²⁴⁾やPrdx2²⁵⁾は細胞内過酸化物質のレベルを抑制することでシグナル伝達をコントロールすることが報告された。これはペルオキシレドキシによるフラッドゲートモデルを支持する。しかし最近、小胞体内のヒトペルオキシレドキシ(Prdx4)が過酸化水素を受容して小胞体内腔タンパク質のジスルフィド結合形成を担うことが示され、²⁶⁾ 哺乳動物細胞でも過酸化水素に電子を与え酸化することでタンパク質のジスルフィド結合形成を促す機能があることが明らかにされた。これは、小胞体の品質管理と

いう点で本質的には異なる現象であるが、我々が提唱するペルオキシレドキシシンによる過酸化物質の受容と標的分子の制御機構を支持するものである。さらに現在、我々は、哺乳動物細胞の細胞質における過酸化物質の感知とそのシグナルの伝達にペルオキシレドキシシンが寄与することを明らかにしつつある。前述したように過酸化物質は増殖シグナル等を制御し、少レベルの負荷は細胞増殖を促進させることから、がん細胞の増殖にも密接に関与する。よって、特定のヒトペルオキシレドキシシンの標的分子と制御機構を解明することは、がんなどの様々な病態を理解し、かつそれを制御する方法の開発に寄与すると考えられる。

REFERENCES

- 1) Beckman K. B., Ames B.N., *J. Biol. Chem.*, **272**, 19633–19636 (1997).
- 2) Berlett B. S., Stadtman E. R., *J. Biol. Chem.*, **272**, 20313–20316 (1997).
- 3) Costa V., Moradas-Ferreira P., *Mol. Aspects Med.*, **22**, 217–246 (2001).
- 4) Droge W., *Physiol. Rev.*, **82**, 47–95 (2002).
- 5) Rhee S. G., *Science*, **312**, 1882–1883 (2006).
- 6) Okazaki S., Naganuma A., Kuge S., *Antioxid. Redox Signal.*, **7**, 327–334 (2005).
- 7) Okazaki S., Tachibana T., Mano N., Kuge S., *Mol. Cell*, **27**, 675–688 (2007).
- 8) Tachibana T., Okazaki S., Murayama A., Nomoto A., Kuge S., *J. Biol. Chem.*, **284**, 4464–4472 (2009).
- 9) Iwai K., Naganuma A., Kuge S., *J. Biol. Chem.*, **285**, 10597–10604 (2010).
- 10) Fourquet S., Huang M. E., D'Aufraux B., Toledano M. B., *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 1565–1576 (2008).
- 11) Wood Z. A., Poole L. B., Karplus P. A., *Science*, **300**, 650–653 (2003).
- 12) Kuge S., Jones N., Nomoto A., *EMBO J.*, **16**, 1710–1720 (1997).
- 13) Delaunay A., Isnard A. D., Toledano M. B., *EMBO J.*, **19**, 5157–5166 (2000).
- 14) Kuge S., Arita M., Murayama A., Maeta K., Izawa S., Inoue Y., Nomoto A., *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6139–6150 (2001).
- 15) Kuge S., Toda T., Iizuka N., Nomoto A., *Genes Cells*, **3**, 521–532 (1998).
- 16) Yan C., Lee L. H., Davis L. I., *EMBO J.*, **17**, 7416–7429 (1998).
- 17) Isoyama T., Murayama A., Nomoto A., Kuge S., *J. Biol. Chem.*, **276**, 21863–21869 (2001).
- 18) Delaunay A., Pflieger D., Barrault M. B., Vinh J., Toledano M. B., *Cell*, **111**, 471–481 (2002).
- 19) Veal E. A., Ross S. J., Malakasi P., Peacock E., Morgan B. A., *J. Biol. Chem.*, **278**, 30896–30904 (2003).
- 20) Park S. G., Cha M. K., Jeong W., Kim I. H., *J. Biol. Chem.*, **275**, 5723–5732 (2000).
- 21) Monje-Casas F., Michan C., Pueyo C., *Biochem. J.*, **383**, 139–147 (2004).
- 22) Lee J., Spector D., Godon C., Labarre J., Toledano M. B., *J. Biol. Chem.*, **274**, 4537–4544 (1999).
- 23) Azevedo D., Nascimento L., Labarre J., Toledano M. B., Rodrigues-Pousada C., *FEBS Lett.*, **581**, 187–195 (2007).
- 24) Choi M. H., Lee I. K., Kim G. W., Kim B. U., Han Y. H., Yu D. Y., Park H. S., Kim K. Y., Lee J. S., Choi C., Bae Y. S., Lee B. I., Rhee S. G., Kang S. W., *Nature (London)*, **435**, 347–353 (2005).
- 25) Yan Y., Sabharwal P., Rao M., Sockanathan S., *Cell*, **18**, 1209–1221 (2009).
- 26) Zito E., Melo E. P., Yang Y., Wahlander A., Neubert T. A., Ron D., *Mol. Cell*, **40**, 787–797 (2010).